



Erik Alexander Heim

Fluxgate-Magnetrelaxometrie magnetischer Nanopartikel in der Bioanalytik

Dissertation
Braunschweig 2009

Fluxgate-Magnetrelaxometrie magnetischer Nanopartikel in der Bioanalytik

Von der Fakultät für Elektrotechnik, Informationstechnik, Physik
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von: Dipl.-Phys. Erik Alexander Heim
aus: Koblenz

eingereicht am: 15.5.2009
mündliche Prüfung am: 21.9.2009

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Meinhard Schilling
Referent: Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel
Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Marc Tornow

2009

Kurzfassung

Magnetische Nanopartikel werden in vielen Bereichen der Medizin und Biotechnologie eingesetzt. Die bekanntesten Anwendungen sind der Einsatz als Kontrastmittel in der Kernspintomografie und zur Separation und Aufreinigung von Biomolekülen. Für alle Anwendungen werden spezialisierte Nanopartikel benötigt. Die Spezialisierung der Nanopartikel kann eine bestimmte Größe und Größenverteilung oder eine Funktionalisierung zur spezifischen Bindung an Zielsubstanzen sein.

In der Bioanalytik können die magnetischen Eigenschaften superparamagnetischer Nanopartikel für ein Nachweisverfahren von Biomolekülen genutzt werden. Die magnetischen Momente der superparamagnetischen Nanopartikel werden in einem Magnetfeld ausgerichtet und relaxieren nach dem Abschalten des Magnetfelds in eine zufällige Ausrichtung. Der zeitliche Zerfall des ausgerichteten Zustands hängt von der Beweglichkeit der Nanopartikel ab. Die Beweglichkeit der Nanopartikel wird bei einer Bindung an Zielsubstanzen verändert und ermöglicht eine Quantifizierung der Zielsubstanzen.

In dieser Arbeit wurde ein Messgerät entwickelt und charakterisiert, mit dem die Magnetrelaxation magnetischer Nanopartikel mit hochempfindlichen Magnetfeldsensoren ohne aufwendige, magnetische Abschirmung bei Raumtemperatur gemessen werden kann. Hierzu wurde eine Messeinheit aufgebaut, die aus Spulen zur stufenförmigen Aufmagnetisierung der Probe besteht und in der zwei Fluxgate-Magnetometer zum Messen des Streufelds integriert sind. Eine differentielle Anordnung der zwei Fluxgate-Magnetometer erlaubt es, magnetische Störsignale zu unterdrücken und das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Zum stufenförmigen Aufmagnetisieren wurde eine Spulenelektronik entwickelt, die einen konstanten Spulenstrom in Bruchteilen der Spulenzzeitkonstanten schaltet. Für die Messung und die Auswertung der Messdaten wurden Programme entwickelt, und die Messunsicherheit sowie die Nachweisgrenze des Systems wurden in Hinblick auf Messungen von kleinsten Konzentrationen an magnetischen Nanopartikeln und Biomolekülen bestimmt.

Mit dem aufgebauten Messsystem wurden Bindungsexperimente mit superparamagnetischen Nanopartikeln an verschiedenen großen Zielsubstanzen durchgeführt, wobei Bindungskinetiken untersucht werden konnten. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 „Vom Gen zum Produkt“ wurde das Verfahren der Magnetrelaxometrie erstmals eingesetzt, um die Vernetzungskinetik und Einbettungskapazität von Hydrogelen zu bestimmen.

Nachdem die Messeinheit in einem ersten Forschungssystem getestet und eingesetzt worden war, wurde ein Demonstrator eines kompletten Messsystems inklusive Messdatenauswertung in der Größe eines 19“-Gehäuses aufgebaut. Ein solches Laborgerät ermöglicht die kostengünstige Qualitätssicherung und Anwendung von magnetischen Nanopartikeln in der Forschung und Industrie.

Abstract

Magnetic nanoparticles find wide application in medicine and biotechnology. Established applications include the use of magnetic nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging and for the separation and purification of biomolecules. The nanoparticles have to be tailored for a given application which, for example, requires a defined size and size distribution or functionalization to specifically bind to targets.

In bioanalytics, the magnetic properties of superparamagnetic nanoparticles can be used to detect biomolecules. The magnetic moments of superparamagnetic nanoparticles are aligned by a magnetic field and after abruptly switching off the field the moments relax into random directions. The temporary decay depends on the mobility of the nanoparticles. The mobility of the nanoparticles changes by binding to targets and offers the possibility to quantify the amount of targets.

A measurement system was developed and characterized that measures the magnetic relaxation with highly sensitive magnetic field sensors at room temperature without the need of costly cooling and magnetic shielding. Coils are built in a measurement unit which magnetizes the sample. In addition, two fluxgate magnetometers were integrated which measure the stray field of the sample. A differential arrangement of the fluxgate magnetometers suppresses interfering signals and increases the signal-to-noise ratio. Coil electronics were developed which switch the coil current in fractions of the coil time constant. To control the measurement cycle and to analyze the magnetorelaxation data, software applications were developed. The measurement uncertainty and the detection limits of the system were determined with respect to measuring small amounts of magnetic nanoparticles and biomolecules.

With this measurement system, binding experiments with superparamagnetic nanoparticles and targets of different sizes were performed. Furthermore, binding kinetics were investigated. Within the scope of the Sonderforschungsbereich 578 “from gene to product”, the method of magnetorelaxation measurement was used to characterize the kinetics of polymerization and load capacities of hydrogels.

After the measurement unit had been tested successfully, a laboratory instrument was developed which integrates the measurement coil system and electronics together with a personal computer in a single 19“ instrument. With this instrument, the characterization of magnetic nanoparticles in terms of size distribution and agglomeration as well as magnetic properties can be investigated. Such a laboratory instrument allows the cost-effective quality control of magnetic nanoparticles and their application in research and industry.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AC	Wechselstrom (Wechselfeld)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
AMR	Anisotroper Magnetoresistiver Effekt
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Biotin-BSA	biotinyliertes Rinderserumalbumin
BNC	BNC-Steckverbinder (bayonet nut connector)
DC	Gleichstrom (Gleichfeld)
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DS	Substitutionsgrad (degree of substitution)
DSPA	<i>Desmodus rotundus Plasminogen</i>
ED	eindomänig
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMG	Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, TU Braunschweig
FEM	Finite-Elemente-Methode
FIR	Filter mit endlicher Impulsantwort (finite impulse response)
FU	Freie Universität
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMI	Giant Magnetic Impedance
GMR	Riesenmagnetwiderstand (giant magnetoresistance)
GREYC	Groupe de Recherche en Informatique, Image, Automatique et Instrumentation de Caen
GUM	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements
HEMA	Hydroxyethyl-Methacrylat
HES	Hydroxyethylstärke
HESEMA	Hydroxyethyl-Methacrylat-Hydroxyethylstärke
HID	Human Interface Device
HT _c	Hoch-T _c (high critical temperature)
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IgG	Immunglobulin G
intgr.	integral
ISO	Internationale Organisation für Normung (international organization for standardization)

Abkürzung	Erklärung
kS	kilosamples
MAR	magnetisches Assay Lesegerät (magnetic assay reader)
MARIA	Magnetisches Relaxationsimmunoassay (magnetic relaxation immunoassay)
MD	Multidomän
MFM	Magnetkraftmikroskopie (magnetic force microscopy)
mg	Milligramm
M(H)	Magnetisierungskurve
mikr.	mikroskopisch
Min.	Minute
mL	Milliliter
MNP	magnetisches Nanopartikel
MORFF	magnetooptische Relaxation von Ferrofluiden
MPI	Magnetic Particle Imaging
MRI	Magnetresonanztomografie (magnetic resonance imaging)
MRX	Magnetorelaxometrie
MS	megasamples
MSM	Momenten-Superposition-Modell
NI	National Instruments
OPV	Operationsverstärker
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Personal Computer
PCI	Peripheral Component Interconnect
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie (photon correlation spectroscopy)
PEEK	Polyetheretherketon
Power-FET	Leistungs-Feldeffekt-Transistor
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SFB	Sonderforschungsbereich
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
Std.	Stunde
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFT	Dünnschichttransistor (thin film transistor)
TMR	Magnetischer Tunnelwiderstand (tunneling magnetoresistance)
TU	Technische Universität
USB	Universal Serial Bus
UV	ultraviolett
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

Symbolverzeichnis

Formelzeichen	Erklärung
α_i	Richtungskosinus
$B_{0,B}$	Amplitude der gestreckten Exponentialfunktion
$B_{0,N}$	Amplitude der ln-Funktion
B_{gebunden}	Amplitude gebundener Nanopartikel
$B_{\text{immobilisiert}}$	Amplitude immobilisierter Nanopartikel
$B_{\text{ln,Probe}}$	Amplitude der ln-Funktion einer Probe
$B_{\text{ln,Referenz}}$	Amplitude der ln-Funktion einer Referenzprobe
B_m	Streufeld während der Magnetisierung
B_{mag}	Magnetisierungsflussdichte
B_{mobil}	Amplitude mobiler Nanopartikel
B_{Offset}	Offset bei der Streufeldmessung
B_r	Streufeld während der Relaxation
$B_{\text{ref,gebunden}}$	Amplitude gebundener Referenz-Nanopartikel
$B_{\text{ref,immobilisiert}}$	Amplitude immobilisierter Referenz-Nanopartikel
$B_{\text{ref,mobil}}$	Amplitude mobiler Referenz-Nanopartikel
$B_{\text{ref,ungebunden}}$	Amplitude ungebundener Referenz-Nanopartikel
$B_{\text{ungebunden}}$	Amplitude ungebundener Nanopartikel
B_{SS}	Spitze-Spitze-Wert der magnetischen Flussdichte
β	Exponent der gestreckten Exponentialfunktion
χ_0	Gleichfeld-Suszeptibilität
χ'	Realteil der komplexen Suszeptibilität
χ''	Imaginärteil der komplexen Suszeptibilität
d_K	Kerndurchmesser
$d_{K,\text{max}}$	d_K beim Maximum der logarithmischen Normalverteilung
E_K	Anisotropieenergie
E_{mag}	magnetische Feldenergie
η	dynamische Viskosität
F	adaptiver Faktor
f	Größenverteilung
f_r	relativer Fehler
h	reduziertes Magnetfeld
H_c	Koerzitivfeldstärke, makroskopisches kritisches Feld
H_K	Anisotropiefeld, Schaltfeld
H_{mag}	Magnetisierungsfeld
k	Erweiterungsfaktor

Formelzeichen	Erklärung
k_B	Boltzmann-Konstante
K_{eff}	effektive Anisotropiekonstante
$K_{\text{u,eff}}$	uniaxiale effektive Anisotropiekonstante
K_{u1}	uniaxiale Anisotropiekonstante erster Ordnung
K_{u2}	uniaxiale Anisotropiekonstante vierter Ordnung
L	Langevin-Funktion
M_s	Sättigungsmagnetisierung
m	magnetisches Moment
μ_0	Vakuumpermeabilität
μ	Maßstabsparameter der logarithmischen Normalverteilung
n	Anzahl
N_x	Entmagnetisierungsfaktor
N_z	Entmagnetisierungsfaktor
σ	Formparameter der logarithmischen Normalverteilung
ω	Kreisfrequenz
P_Ψ	Richtungswahrscheinlichkeit
s	empirische Standardabweichung
S	magnetische Viskosität
T	Temperatur
t_{mag}	Magnetisierungszeit
τ_0	atomare Reorganisationszeit
τ_B	Zeitkonstante der gestreckten Exponentialfunktion
τ_{Brown}	Brown-Zeitkonstante eines magnetischen Nanopartikels
τ_{eff}	effektive Zeitkonstante eines magnetischen Nanopartikels
$\tau_{\text{eff,H}}$	effektive Zeitkonstante eines magnetischen Nanopartikels in einem äußeren Magnetfeld
τ_{gebunden}	Zeitkonstante gebundener Nanopartikel
$\tau_{\text{immobilisiert}}$	Zeitkonstante immobilisierter Nanopartikel
τ_{mobil}	Zeitkonstante mobiler Nanopartikel
τ_N	Zeitkonstante der ln-Funktion
$\tau_{\text{Néel}}$	Néel-Zeitkonstante eines magnetischen Nanopartikels
$\tau_{\text{Néel,H}}$	Néel-Zeitkonstante eines magnetischen Nanopartikels in einem äußeren Magnetfeld
$\tau_{\text{ref,gebunden}}$	Zeitkonstante gebundener Referenz-Nanopartikel
$\tau_{\text{ref,ungebunden}}$	Zeitkonstante ungebundener Referenz-Nanopartikel
$\tau_{\text{ref,immobilisiert}}$	Zeitkonstante immobilisierter Referenz-Nanopartikel
$\tau_{\text{ref,mobil}}$	Zeitkonstante mobiler Referenz-Nanopartikel
$\tau_{\text{ungebunden}}$	Zeitkonstante ungebundener Nanopartikel
V_h	hydrodynamisches Volumen
V_K	Kernvolumen
V_k	Variationskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	iii
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
Symbolverzeichnis	ix
Einleitung	1
1 Grundlagen	3
1.1 Magnetische Nanopartikel und Ferrofluide	4
1.1.1 Eigenschaften und Anwendungen	4
1.1.2 Superparamagnetismus	7
1.1.3 Magnetische Anisotropien	8
1.1.4 Stoner-Wohlfarth-Modell	9
1.1.5 Langevin-Funktion	11
1.1.6 Gleichfeld-Suszeptibilität	13
1.2 Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Nanopartikel	15
1.2.1 Mechanismen	15
1.2.2 Néel-Zeitkonstante im Magnetfeld	18
1.3 Modelle zur Beschreibung von Magnetrelaxometriedaten	20
1.3.1 Momenten-Superpositions-Modell	20
1.3.2 Cluster-Momenten-Superpositions-Modell	20
1.3.3 Näherungsmodelle	21
1.3.4 Phänomenologische Modelle	21
1.4 Methoden zur Charakterisierung von Ferrofluiden	23
1.5 Stand der Technik magnetischer Nanopartikel als Marker in der Bioanalytik	27
1.6 Magnetisches Relaxationsimmunoassay	29
1.6.1 Prinzip und Durchführung	29
1.6.2 Auswertung von Magnetrelaxationsdaten	30
1.6.3 Anforderungen an ein Messsystem	31
1.6.4 Magnetfeldsensoren	32
2 Entwicklung der Messsysteme	35
2.1 MRX-Forschungssystem	36
2.1.1 Spule und Spulenelektronik	36
2.1.2 Messwertaufnahme	39

2.2	MRX-Analyzer	45
2.2.1	Spule und Spulenelektronik	46
2.2.2	Messwertaufnahme	48
2.3	Software zur Datenauswertung und Simulation	50
3	Charakterisierung des MRX-Forschungssystems	53
3.1	Verifizierung des MRX-Forschungssystems	54
3.1.1	Vergleich mit dem PTB-SQUID-System	54
3.1.2	Einfluss der Position der Fluxgate-Sensoren auf die Messergebnisse	55
3.2	Messunsicherheit des MRX-Forschungssystems	60
3.2.1	Spezifikation der Messgröße	60
3.2.2	Aufstellen der Prozessgleichung	60
3.2.3	Identifizierung der Unsicherheitsquellen	61
3.2.4	Quantifizierung der Unsicherheitsquellen	64
3.3	Untersuchung systematischer Messunsicherheitseinflüsse	70
3.3.1	Homogenität der Probe	70
3.3.2	Sedimentation der Probe	71
3.3.3	Statisches Hintergrundfeld	72
3.4	Untersuchungen für die Methodvalidierung eines Bindungsnachweises	74
3.4.1	Validierungsdaten	74
3.4.2	Einfluss der mathematischen Auswertung	79
3.4.3	Experimentelles Modell	80
3.5	Ermittlung der Gesamtunsicherheit	83
4	Charakterisierung von Ferrofluiden	85
4.1	Mikroskopische Methoden	86
4.1.1	REM	86
4.1.2	TEM	87
4.2	Integrale Methoden	88
4.2.1	Magnetische Gleichfeld-Suszeptibilität	88
4.2.2	Magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität	89
4.2.3	Photonenkorrelationsspektroskopie	90
4.2.4	Magnetrelaxometrie	91
4.3	Vergleich der verwendeten Methoden	93
4.4	Magnetrelaxometrie für die Herstellung, Qualitätssicherung und Anwen- dung von Ferrofluiden	95
5	Anwendungen in der Bioanalytik	97
5.1	Einfluss der dynamischen Viskosität von Trägerflüssigkeiten	98
5.1.1	Versuchsbeschreibung	98
5.1.2	Materialien	98
5.1.3	Versuchsdurchführung	98
5.1.4	Ergebnisse und Diskussion	99
5.2	Das Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem	103
5.3	Immobilisierung Streptavidin-funktionalisierter magnetischer Nanopar- tikel an biotinylierten Agarose-Beads	104

5.3.1	Versuchsbeschreibung	104
5.3.2	Materialien	105
5.3.3	Bindungskinetik	105
5.3.4	Bindungsfähigkeit	108
5.4	Quervernetzung Streptavidin-funktionalisierter magnetischer Nanopartikel mit biotinyliertem BSA	112
5.4.1	Versuchsbeschreibung	112
5.4.2	Materialien	113
5.4.3	Vernetzungsfähigkeit	114
5.4.4	Bindungskinetik	115
5.5	Charakterisierung von Hydrogelen	117
5.5.1	Hydrogele	117
5.5.2	Einbau superparamagnetischer Nanopartikel	118
5.5.3	Vernetzungskinetik und Einbettungskapazität	122
5.5.4	Freisetzungskinetik	127
5.6	Schlussfolgerungen	127
Zusammenfassung und Ausblick		129
Eigene Veröffentlichungen und Publikationen		131
Literaturverzeichnis		137
Tabellenverzeichnis		147
Abbildungsverzeichnis		149
Danksagung		153
Sachregister		155

Einleitung

Die in dieser Arbeit untersuchten magnetischen Nanopartikel bestehen aus einem magnetischen Kern und einer Hülle. Sie zeigen aufgrund ihrer geringen Größe im Nanometerbereich besondere Eigenschaften, die für viele Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin genutzt werden können. Ihre geringe Größe erlaubt es, mit Proteinen, Antikörpern oder Zellen zu interagieren oder Bindungen einzugehen, ohne deren Eigenschaften wesentlich zu beeinflussen [1]. Die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel ändern sich stark mit ihrer Größe. Für Anwendungen können über die Größe der Nanopartikel gewünschte magnetische Eigenschaften eingestellt werden. Ihr magnetisches Feld kann als Signal mit einem Magnetfeldsensor detektiert werden oder sie können mit einem äußeren Magnetfeld bewegt oder sogar erwärmt werden.

Magnetische Nanopartikel werden erfolgreich in der Biotechnologie zum Aufreinigen und Nachweisen von Biomolekülen und in bildgebenden Methoden der Medizin als Kontrastmittel für die Kernspintomografie eingesetzt. Weitere Anwendungen sind in der Erforschung oder kurz vor der Markteinführung. In der Krebstherapie werden sie in klinischen Studien eingesetzt, um Tumorzellen gezielt zu erwärmen und abzutöten oder andere Therapieformen wie die Chemotherapie zu unterstützen. Mit medizinischen Wirkstoffen beladene Nanopartikel können durch ein Magnetfeld geführt und die Wirkstoffe nur am Zielort angewendet werden.

In dieser Arbeit wird eine besondere magnetische Eigenschaft von Nanopartikeln untersucht. Unterhalb einer materialspezifischen Größe zeigen magnetische Nanopartikel so genanntes superparamagnetisches Verhalten. Nachdem sie durch einen magnetischen Puls ausgerichtet worden sind, werden sie durch die thermische Energie wieder zufällig ausgerichtet. Eine Probe mit superparamagnetischen Nanopartikeln relaxiert vom ausgerichteten magnetischen Zustand in einen zufälligen, nicht magnetischen Zustand. Die Relaxationsdauer hängt von der Größe des Nanopartikels und seiner Umgebung ab. In der Bioanalytik lassen sich mit solchen magnetischen Nanopartikeln biochemische Stoffe markieren und quantitativ nachweisen. Gebundene und ungebundene magnetische Nanopartikel zeigen ein unterschiedliches magnetisches Relaxationsverhalten. Hierdurch kann die Menge gebundener Marker in Anwesenheit von ungebundenen Markern messtechnisch erfasst und die Menge des nachzuweisenden Stoffes bestimmt werden. Zeitaufwendige Auswaschschritte von ungebundenen Markern sind nicht notwendig. Auch Nachweise in trüben Medien wie Vollblut sind möglich, da das magnetische Signal gemessen wird. Für eine mögliche *in vivo* Anwendung bieten sich Nanopartikel aus Eisenoxid an, die schon in der Kernspintomografie als Kontrastmittel zugelassen sind. Im Vergleich zu radioaktiven Markern ist die Benutzung ungefährlich, und die magnetischen Eigenschaften sind langfristig stabil.

In einem gemeinsamen Projekt der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Berlin und dem Institut für Diagnostikforschung GmbH der FU Berlin wurde das auf der

Magnetrelaxation basierende Nachweisverfahren entwickelt und untersucht [2–7]. Um die magnetischen Nanopartikel nachzuweisen, wurden bisher hocheinsensitive SQUID-Magnetometer benutzt, die gekühlt werden müssen und sehr anspruchsvoll in der Handhabung sind.

Im Sonderforschungsbereich 578 „Vom Gen zum Produkt“ sollen magnetische Nanopartikel zur prozessbegleitenden Analytik eingesetzt werden. Hierzu ist ein Messgerät entwickelt worden, das ebenfalls die magnetischen Relaxationssignale der Nanopartikel misst und aufzeichnet, wobei allerdings als Magnetfeldsensoren Fluxgate-Sensoren zum Einsatz kommen, die bei Raumtemperatur betrieben werden. Mit diesen lässt sich ein kostengünstiges und einfach zu handhabendes System aufbauen. Die Fluxgate-Sensoren erlauben weiterhin, das magnetische Signal der Probe auch während der Magnetisierung zu messen, um zusätzliche Informationen zu erhalten. Der Messzyklus einer Relaxationsmessung ist nach ein paar Sekunden abgeschlossen.

Alle zuvor genannten Anwendungen von magnetischen Nanopartikeln benötigen angepasste Eigenschaften der Nanopartikel. Um die Qualität dieser Eigenschaften schon während der Produktion und vor der Anwendung zu überprüfen, eignet sich das Verfahren der Magnetrelaxometrie aufgrund seiner einfachen und schnellen Anwendung.

In **Kapitel 1** werden die physikalischen Grundlagen magnetischer Nanopartikel, Messmethoden zu ihrer Charakterisierung und ihre Anwendung als Marker in der Bioanalytik beschrieben. Das Prinzip und der Aufbau des Forschungssystems wird in **Kapitel 2** beschrieben. Nach erfolgreicher Anwendung des Forschungssystems ist ein Demonstrator eines Laborgeräts in Form eines 19"-Computergehäuses aufgebaut worden. Er besteht aus einem handelsüblichen PC und der Messeinheit zur Messung der Magnetisierung und Relaxation von magnetischen Nanopartikeln. Mit der im PC integrierten Datenaufnahme ist es möglich, das System zur Charakterisierung von Nanopartikeln zu nutzen. In **Kapitel 3** erfolgt eine Systemcharakterisierung des Messaufbaus, und seine Messunsicherheiten werden identifiziert und bestimmt. Abschließend erfolgt eine Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze für gebundene Nanopartikel in fester Phase. In **Kapitel 4** wird auf die Charakterisierung der Größenverteilung sowie der magnetischen Eigenschaften von Nanopartikeln mit dem Verfahren der Magnetrelaxometrie eingegangen. Die Ergebnisse werden mit anderen etablierten Verfahren verglichen. In **Kapitel 5** werden Anwendungen der magnetischen Nanopartikel mit dem entwickelten Messsystem durchgeführt. Zuerst wird der Einfluss der Viskosität einer Probe untersucht. Im Hinblick auf den Nachweis von Biomolekülen werden mit dem Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem als Ligand und Rezeptor verschiedene Bindungsszenarien untersucht. Dabei wird auch die zeitliche Auflösung des Verfahrens demonstriert, die es ermöglicht, Bindungskinetiken im Sekundenbereich zu untersuchen. Abschließend wird der Herstellungsprozess von Hydrogelen untersucht. Hydrogele werden im Sonderforschungsbereich 578 mit dem Ziel hergestellt, Langzeitdepots für medizinische Wirkstoffe zu bieten. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie und dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig wurden magnetische Nanopartikel als Wirkstoffersatz in Hydrogele eingebettet. Während der Bildung des Gels wurde mit einer Zeitauflösung im Sekundenbereich die Beweglichkeit der magnetischen Nanopartikel gemessen. Über die Beweglichkeit wurden dann die Vernetzungskinetik und die Einbettungskapazität in Abhängigkeit der Nanopartikelbeladung bestimmt. Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick.

1 Grundlagen

Zu Beginn dieses Kapitels werden die Eigenschaften magnetischer Nanopartikel und deren Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin beschrieben. Es werden die magnetischen Eigenschaften erklärt, die zum Verständnis des Verhaltens von magnetischen Nanopartikeln in veränderlichen Magnetfeldern notwendig sind.

Beim Verfahren der Magnetrelaxometrie wird nach dem Abschalten eines Magnetisierungsfelds der zeitliche Verlauf des Abklingens des Streufelds der magnetischen Nanopartikel gemessen. Es werden verschiedene Modelle beschrieben, mit denen die Größenverteilung sowie die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel aus den Messdaten bestimmt werden können. Zum Vergleich werden weitere Charakterisierungsmethoden für magnetische Nanopartikel vorgestellt.

Für die Anwendung magnetischer Nanopartikel als Marker in der Bioanalytik wird ein Überblick der möglichen Messmethoden gegeben. Danach wird das magnetische Relaxations-Immunoassay beschrieben. Dabei werden die Anforderungen an ein Messgerät spezifiziert, die bei den in dieser Arbeit entwickelten Messsystemen berücksichtigt werden müssen. Zur Detektion des Streufelds der magnetischen Nanopartikel werden Fluxgate-Magnetfeldsensoren eingesetzt, die mit anderen Magnetfeldsensoren verglichen werden.

verringerten Magnetisierung im Randbereich kommen [13].

Der magnetische Kern kann mit einer Hülle versehen werden, die verschiedene Aufgaben hat. Sie schützt den magnetischen Kern vor weiterer Oxidation und gewährleistet über mehrere Monate bis zu einigen Jahren ein stabiles magnetisches Signal, wie aus Herstellerangaben magnetischer Nanopartikel entnommen werden kann. Über die Hülle kann das Nanopartikel funktionalisiert werden. Es können z.B. medizinische Wirkstoffe oder Liganden zur spezifischen Bindung angebracht werden [14]. Für die praktische Anwendung werden magnetische Nanopartikel in ein Lösungsmittel suspendiert und liegen dann als magnetische Flüssigkeit (engl. Ferrofluid) vor. Die Hülle reduziert eine Agglomeration durch magnetische Wechselwirkungen der Nanopartikel, indem sie einen Mindestabstand der magnetischen Kerne gewährleistet. In dieser Arbeit bezeichnet der Begriff Agglomeration sowohl lockere Anlagerungen als auch feste Verbindungen von Partikeln [15]. Eine Agglomeration wird auch durch sterische Stabilisierung mit langkettigen Hüllenmolekülen oder elektrostatischer Stabilisierung über die Hülle verhindert. Beide Stabilisierungen wirken der Van der Waals-Anziehung entgegen. Um eine Sedimentation zu unterbinden, dürfen die Partikel eine bestimmte Größe nicht überschreiten. Für biotechnologische und medizinische Anwendungen ist eine Suspension in Wasser notwendig.

In Abbildung 1.1(b) ist ein Bindungsassay zum Nachweis eines Analyten mittels funktionalisierter Nanopartikel gezeigt. Die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, engl. phosphate buffered saline) und die Hydroxidionen symbolisieren ein Medium mit einem speziellen Salzgehalt und pH-Wert, in dem die funktionalisierten Nanopartikel eingesetzt werden. Sie sollten unter diesen Umgebungszuständen nicht agglomerieren. In der Abbildung sind die magnetischen Nanopartikel mit Antikörpern funktionalisiert, um spezifisch an den Analyten zu binden. Wie der quantitative Nachweis des Analyten mit magnetischen Nanopartikeln erfolgt und welche Vorteile sie gegenüber herkömmlichen fluoreszierenden, radioaktiven oder enzymatischen Markern haben, wird in den Kapitel 1.5 und 1.6 beschrieben.

Herstellung

Um magnetische Partikel mit einem Durchmesser im Nanometerbereich herzustellen, existieren „top-down“- und „bottom-up“-Verfahren. Erstere sind das Mahlen von Material bis zu einer gewünschten Größe [16] oder lithografische Techniken [17]. Zu den „bottom-up“-Verfahren zählen unter anderem die chemischen Synthesen von magnetischen Nanopartikeln, wie Mitfällung, thermische Zersetzung, Mikroemulsion oder Hydrothermalsynthese [13] und die Herstellung aus der Gasphase [18]. Eine neue Methode ist, Material in einer stabilisierenden Trägerflüssigkeit mit einem gepulsten Laser abzutragen und die entstehenden Nanopartikel gleichzeitig mit einer funktionalisierten Hülle zu versehen [19]. Eine Herausforderung an die Herstellungsverfahren ist es, die Nanopartikel je nach Anwendung in einer genau spezifizierten Größenverteilung und Form herzustellen, da ihre magnetischen Eigenschaften sehr stark von Größe und Form abhängen. Alle in dieser Arbeit benutzten Ferrofluide sind mit dem Mitfällungsverfahren in wässriger Trägerflüssigkeit hergestellt worden und haben einen magnetischen Kern aus Magnetit.

Anwendungen

Die Anwendungen der magnetischen Nanopartikel in der Biotechnologie und Medizin sind vielfältig [1, 20]. Sie lassen sich in die Bereiche *in vitro* und *in vivo* unterteilen [21]. Insbesondere bei *in vivo* Anwendungen im Menschen müssen die magnetischen Nanopartikel bei Anwendung in physiologischer Umgebung stabil sein und dürfen nicht agglomerieren und Gefäße verschließen. Dies kann durch eine geeignete biokompatible Hülle sichergestellt werden, die die Agglomeration verhindert und gewährleistet, dass die magnetischen Nanopartikel wieder ausgeschieden werden können.

In der bildgebenden medizinischen Diagnostik werden Eisenoxide eingesetzt, da sie in den applizierten Mengen nicht toxisch und im Körper abbaubar sind [22]. Als Kontrastmittel in der Kernspintomografie (MRI, engl. Magnetic Resonance Imaging) haben sie eine medizinische Zulassung für die *in vivo* Anwendung [23]. Ihr starkes magnetisches Moment verursacht bei kleinsten Mengen einen hohen Kontrast [24]. Über ihre Größe kann bestimmt werden, in welchen Geweben oder Gefäßen sie sich anreichern [25], und es können gezielt anatomische Strukturen wie Blutgefäße oder Tumoren hervorgehoben werden. Um eine gezieltere Anreicherung in krankhaften Zellen auf molekularer Ebene zu erreichen, können die Nanopartikel mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden [26]. Somit ist es möglich, Tumorzellen schon im Frühstadium zu erkennen. Mit Hilfe von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln ist eine Markierung von Stammzellen möglich. Die markierten Zellen können dann mit dem MRI-Verfahren im Körper lokalisiert werden, um ihre Wirkungsweise zu untersuchen [27].

Ein neues bildgebendes Verfahren mit magnetischen Nanopartikeln wurde von Weizenecker und Gleich (Philips Technologie GmbH Forschungslaboratorien, Hamburg) eingeführt [28]. Mit dem Magnetic Particle Imaging (MPI) ist es möglich, die Verteilung magnetischer Nanopartikel innerhalb eines Volumens 3-dimensional abzubilden. Dazu werden außerhalb eines kleinen, feldfreien Punkts die magnetischen Nanopartikel über ein externes magnetisches Gradientenfeld gesättigt. In dem feldfreien Punkt wird die Reaktion der Nanopartikel auf ein oszillierendes Magnetfeld ausgewertet. Mit diesem neuen Verfahren sollen im Vergleich zur Kernspintomografie kleinere und günstigere Geräte mit einer räumlichen Auflösung unter einem Millimeter möglich sein.

Eine therapeutische *in vivo* Anwendung ist die Hyperthermiebehandlung von Krebspatienten. Dabei werden die im Tumor angereicherten Nanopartikel mit einem magnetischen Wechselfeld erwärmt, und in Kombination mit weiteren Medikamenten werden die Tumorzellen zerstört [29]. Hierzu können funktionalisierte magnetische Nanopartikel benutzt werden, die spezifisch Tumorzellen aufsuchen [30]. In der Anwendung des gezielten Medikamententransports (drug targeting) wird die Eigenschaft der magnetischen Nanopartikel genutzt, dass sie mit magnetischen Gradientenfeldern bewegt werden können. Hiermit können mit medizinischen Wirkstoffen beladene Nanopartikel auf den pathologischen Ort beschränkt werden [31]. Intensiv wird an funktionalisierten Nanopartikeln für medizinische *in vivo* Anwendungen geforscht. Durch die Funktionalisierung wird es künftig möglich sein, die Nanopartikel spezifisch einzusetzen [32]. In der Biotechnologie werden magnetische Nanopartikel hauptsächlich zum spezifischen Aufreinigen und Sortieren von Biomolekülen oder Zellen benutzt [33, 34]. Der Stand der Technik zum Nachweis von Biomolekülen mit magnetischen Nanoteilchen wird in Kapitel 1.5 beschrieben.

1.1.2 Superparamagnetismus

Die magnetischen Eigenschaften eines ferromagnetischen Materials ändern sich signifikant, wenn seine Ausdehnung in den Nanometerbereich verkleinert wird. Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen wird größer und Flächenenergien erlangen größere Bedeutung. Abbildung 1.2 zeigt qualitativ das zeitliche Mittel der Koerzitivfeldstärke H_c in Abhängigkeit des Kerndurchmessers d_K . Die Koerzitivfeldstärke H_c ist die magnetische Feldstärke, die aufgebracht werden muss, um ein Material mit mehreren magnetischen Bezirken zu entmagnetisieren. Bei Partikeln mit nur einem Bezirk muss die Koerzitivfeldstärke H_c aufgebracht werden, um die Magnetisierung in die entgegengesetzte Richtung zu drehen. In Partikeln mit einem Kerndurchmesser d_K größer d_0 bilden sich mehrere Weißsche Bezirke aus, die durch Bloch-Wände getrennt werden. Man nennt diese Partikel Mehrdomänenpartikel (MD, engl. multi-domain). Innerhalb der Domänen tragen alle atomaren magnetischen Momente gleich stark zur Magnetisierung der Domäne bei. Das magnetische Moment des Partikels ist die Summe über alle Domänenmomente. Für diese Partikel ist es energetisch günstiger, durch Bildung von Domänen die magnetostatische Feldenergie (Streufeldenergie) zu reduzieren. Die magnetostatische Energie vergrößert sich proportional zum Volumen. Die Bildung von Bloch-Wänden, welche die Domänen trennen, ist jedoch energetisch aufwendiger, je dünner diese werden bzw. je kleiner das Volumen wird [36]. Zu kleineren Volumen steigt hierdurch die Koerzitivfeldstärke an, da die Möglichkeiten zur Bloch-Wandausbildung und Verschiebung eingeschränkt werden. Bei dem Maximum der Koerzitivfeldstärke bei d_0 ist es energetisch ungünstig, Bloch-Wände auszubilden und das Partikel ist im Eindomänenzustand (ED) [37]. Hier erreicht die Koerzitivfeldstärke H_c ein Maximum, da alle atomaren magnetischen Momente in die gleiche Richtung zum magnetischen Moment m des Partikels beitragen. Das

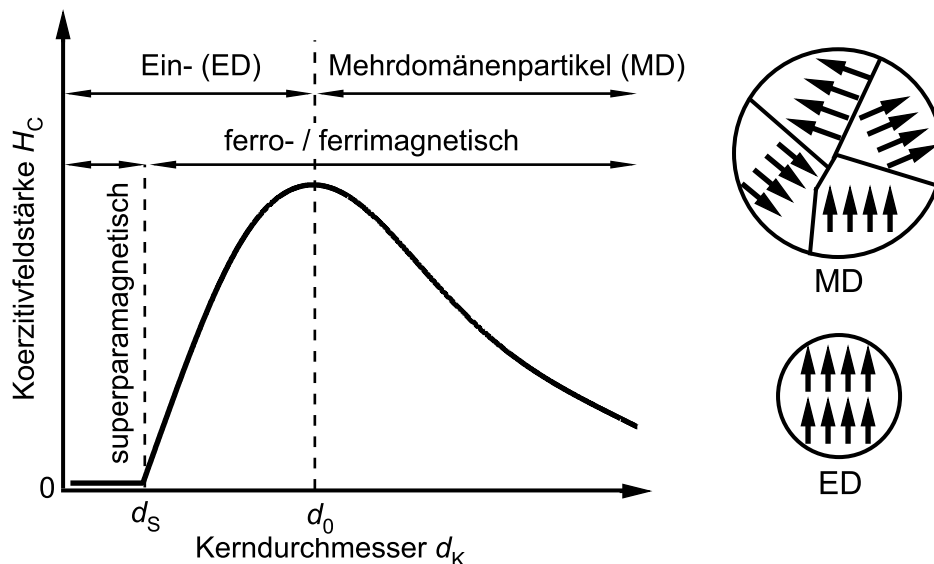


Abb. 1.2 – Prinzipieller Verlauf des zeitlichen Mittels der Koerzitivfeldstärke H_c in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser (nach [35]).

magnetische Moment m eines Eindomänenpartikels mit dem Kernvolumen V_K ergibt sich zu

$$m = V_K M_S. \quad (1.1)$$

Das magnetische Moment eines Eindomänenpartikels weist daher auch in Abwesenheit eines äußeren Felds die Sättigungsmagnetisierung M_S auf. Für Massenspeicher sind Eindomänenpartikel interessant, da eine hohe Magnetisierung ein Auslesen kleinster Strukturen ermöglicht und eine hohe Koerzitivfeldstärke einen Informationsverlust durch Ändern der Magnetisierung verhindert [38].

Nach dem Übergang zum Eindomänenpartikel sinkt die Koerzitivfeldstärke wieder, da sie vom Volumen abhängt. Bei dem Kerndurchmesser d_s ist die thermische Energie so groß, dass das magnetische Moment des Nanopartikels fluktuiert. Ohne äußeres Feld und zeitlich gemittelt ist die Magnetisierung des Nanopartikels Null. Dies ist die Grenze zum Superparamagnetismus. In einem äußeren Feld werden sich die Momente entlang des Felds ausrichten. Dieses Verhalten entspricht einem paramagnetischen Material mit dem Unterschied, dass die magnetische Suszeptibilität viel größer ist. Daher werden diese Nanopartikel als superparamagnetisch bezeichnet. Da die Magnetisierung durch das Fluktuieren des magnetischen Moments im Kernvolumen geändert wird, spricht man genauer vom intrinsischen Superparamagnetismus. Für Magnetit beträgt die Grenze zum intrinsischen Superparamagnetismus $d_s = 30$ nm und der Übergang zwischen Ein- und Mehrdomänenpartikel erfolgt bei ca. $d_0 = 80$ nm [10].

1.1.3 Magnetische Anisotropien

Die magnetische Anisotropie beschreibt die Orientierung der Magnetisierung innerhalb eines Materials entlang ausgezeichneter Richtungen, den so genannten magnetisch leichten Achsen. Dabei wird die magnetische Anisotropieenergie E_K minimiert. Ohne äußeres Feld ist die Magnetisierung parallel oder antiparallel zur leichten Achse ausgerichtet. Um die Magnetisierung senkrecht zu einer leichten Achse auszurichten, muss die magnetische Anisotropieenergie E_K aufgewendet werden. Die magnetische Anisotropie setzt sich aus mehreren Anteilen zusammen, wie z.B. Kristall-, Form-, magnetoelastische oder Oberflächenanisotropie. Für magnetische Nanopartikel ($d_K \gtrsim 5$ nm) sind die relevanten Beiträge Kristall- und Formanisotropie.

Kristallanisotropie

Die Kristallanisotropie beschreibt die energetisch günstigsten Richtungen entlang bestimmter Kristallachsen. Für einen kubischen Kristall, wie Magnetit, ist die Kristallanisotropieenergie

$$E_K = K_1 V_K (\alpha_1^2 \alpha_2^2 + \alpha_2^2 \alpha_3^2 + \alpha_3^2 \alpha_1^2) + K_2 V_K \alpha_1^2 \alpha_2^2 \alpha_3^2. \quad (1.2)$$

Die Richtungskosinus α_i geben dabei die Richtung der Magnetisierung zu den kristallografischen Achsen an. Die Konstanten K_1 und K_2 werden experimentell bestimmt und sind die Anisotropiekonstanten. Für Magnetit ist $K_1 = -1,35 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$. Bei negativem K_1 und diagonalen Richtungen $\langle 111 \rangle$ wird E_K negativ, während für die Richtungen $\langle 100 \rangle$ $E_K = 0$ ist. Die vier diagonalen Raumrichtungen $\langle 111 \rangle$ sind bei Magnetit energetisch am günstigsten und bilden daher die leichten Achsen [10].

Formanisotropie

Die Formanisotropie ist durch das Entmagnetisierungsfeld bestimmt. Das Entmagnetisierungsfeld ist der Magnetisierung entgegengesetzt und von der Form des Körpers abhängig. Die Magnetisierung richtet sich aufgrund der Form des Körpers aus, so dass die magnetostatische Energie minimiert wird. Der Betrag der Formanisotropiekonstante eines Rotationsellipsoids errechnet sich zu

$$K_{\text{Form}} = \frac{1}{2} (N_z - N_x) M_S^2. \quad (1.3)$$

Dabei bezeichnen N_z und N_x die Entmagnetisierungsfaktoren entlang der in z-Richtung gewählten langen Achse des Ellipsoids und der dazu senkrecht stehenden Achse x.

Effektive Anisotropie magnetischer Nanopartikel

Die leichte Achse wird durch die Anisotropie des Nanopartikels bestimmt, die sich aus den Beiträgen der Kristall- und Formanisotropie ergibt und in einer effektiven Anisotropiekonstanten K_{eff} zusammengefasst wird. Für Materialien mit hoher Sättigungsmagnetisierung M_S wie Magnetit ist die Formanisotropie dominierend [10]. Die Anisotropieenergie kann für uniaxiale Nanopartikel mit

$$E_{Ku} = K_{u1} V_K \sin^2 \Theta + K_{u2} V_K \sin^4 \Theta \quad (1.4)$$

und höheren Termen beschrieben werden. Wird nur der Term erster Ordnung berücksichtigt, ergibt sich:

$$E_{Ku} = K_u V_K \sin^2 \Theta. \quad (1.5)$$

Für Anisotropiekonstanten $K_u > 0$ ist Θ der Winkel zwischen Magnetisierung und leichter Achse.

1.1.4 Stoner-Wohlfarth-Modell

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, gibt es viele Situationen, bei denen für magnetische Nanopartikel eine uniaxiale Anisotropie vorliegen kann. Sind die Partikel kugelförmig und eindomänig, so dass sich ihre Magnetisierung aufgrund von nicht vorhandenen Domänenwänden kohärent dreht, spricht man von Stoner-Wohlfarth-Partikeln. Für nicht wechselwirkende Partikel kann das Modell von Stoner und Wohlfarth [39] angewendet werden, welches die Richtungsabhängigkeit der Magnetisierung von einem äußeren Magnetfeld beschreibt und mit dem sich die Magnetisierungskurve eines Eindomänenpartikels mit uniaxialer Anisotropie berechnen lässt. Für die weitere Betrachtung werden in Abbildung 1.3 der Winkel Φ zwischen der leichten Achse und dem äußeren Feld H_{mag} , der Winkel Θ zwischen der leichten Achse und dem magnetischen Moment m und der Winkel Ψ zwischen dem magnetischen Moment m und dem äußeren Feld H_{mag} definiert. Bei der Drehung der Magnetisierung konkurriert die magnetostatische Feldenergie E_{mag} mit der Anisotropieenergie E_K des Nanopartikels. In erster Näherung gilt für die Anisotropieenergie eines uniaxialen Nanopartikels

$$E_{Ku} = K_{\text{eff}} V_K \sin^2 \Theta. \quad (1.6)$$

Die magnetische Feldenergie E_{mag} ist

$$E_{\text{mag}} = -\mu_0 V_K M_S H_{\text{mag}} \cos(\Theta - \Phi), \quad (1.7)$$

wobei V_K das Kernvolumen und M_S die Sättigungsmagnetisierung des Nanopartikels sind. H_{mag} ist das äußere Magnetfeld mit einem Winkel $\Theta - \Phi = \Psi$ zum magnetischen Moment m . Die Gesamtenergie des Partikels ist die Summe der beiden Energien:

$$E_{\text{ges}} = K_{\text{eff}} V_K \sin^2 \Theta - \mu_0 V_K M_S H_{\text{mag}} \cos(\Theta - \Phi). \quad (1.8)$$

Ein stabiles Energieminimum ergibt sich bei

$$dE_{\text{ges}}/d\Theta = 0 \quad \text{und} \quad d^2 E_{\text{ges}}/d\Theta^2 > 0. \quad (1.9)$$

Für den Fall, dass das äußere Magnetfeld parallel zur leichten Achse (l.A. in Abbildung 1.3) liegt ($\Phi = 0$), liegen die Energieminima für das magnetische Moment parallel und antiparallel zur leichten Achse. Um sich parallel zum äußeren Magnetfeld auszurichten, muss ein antiparalleles magnetisches Moment die Energiebarriere

$$\Delta E_{\text{ges}} = \Delta E_{\rightleftharpoons} \quad (1.10)$$

$$\Delta E_{\text{ges}} = E_{\text{ges}}(\Theta = \pi/2) - E_{\text{ges}}(\Theta = \pi) \quad (1.11)$$

überwinden. Das äußere Magnetfeld, das zum Überwinden dieser Energiebarriere aufgebracht werden muss, ist die Feldstärke H_K , die als mikroskopische Koerzitivfeldstärke oder Anisotropiefeldstärke bezeichnet wird:

$$H_K = \frac{2K_{\text{eff}}}{\mu_0 M_S}. \quad (1.12)$$

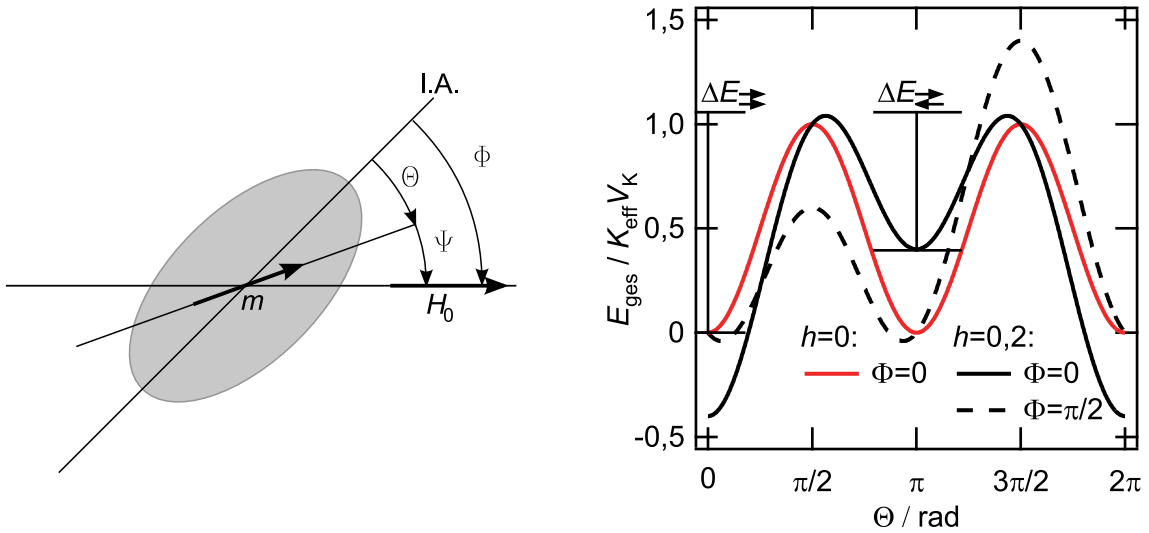


Abb. 1.3 – Winkeldefinitionen Φ und Ψ der leichten Achse und des magnetischen Moments eines magnetischen Nanopartikels zum äußeren Magnetfeld.

Abb. 1.4 – Abhängigkeit der Feldenergie vom Winkel Θ des magnetischen Moments zur leichten Achse für verschiedene Winkel Φ des äußeren Magnetfelds zur leichten Achse.

In Abbildung 1.4 ist die Gesamtenergie E_{ges} in Abhängigkeit vom Winkel Θ zwischen Magnetisierung und leichter Achse für verschiedene Winkel Φ des äußeren Felds zur leichten Achse dargestellt. Verschieden große äußere Magnetfelder sind durch den reduzierten Parameter h ausgedrückt:

$$h = \frac{H_{\text{mag}}}{H_K}. \quad (1.13)$$

Wenn das äußere Feld nicht parallel zur leichten Achse liegt, muss eine geringere Energiebarriere, z.B. $\Delta E_{\text{ges}} = \Delta E_{\Rightarrow, \Phi=\pi/2}$ der gestrichelten Energiekurve in Abbildung 1.4, überwunden werden und H_K ist reduziert. Die makroskopische Koerzitivfeldstärke H_c einer Probe, in der die Nanopartikel zufällig orientiert in einer festen Matrix liegen, ist die über alle Winkel Φ gemittelte mikroskopische Koerzitivfeldstärke $\langle H_K \rangle$. Die makroskopische Koerzitivfeldstärke H_c beträgt in diesem Fall ungefähr die Hälfte der mikroskopischen H_K [10]. H_K ist auch von der Art der Anisotropie abhängig. Bei einem kubischen Kristall mit multiaxialer Anisotropie (Gleichung 1.2) ist H_K kleiner als bei uniaxialer Anisotropie [10]:

$$H_K = \frac{4|K_1|}{3\mu_0 M_S}. \quad (1.14)$$

Die weiteren theoretischen Überlegungen in diesem Kapitel gehen von Stoner-Wohlfarth-Partikeln aus.

1.1.5 Langevin-Funktion

Die Abhängigkeit der Magnetisierung von der Temperatur und dem äußeren Magnetfeld kann für Paramagneten über die klassische Langevin-Funktion beschrieben werden. Dabei wird vorausgesetzt, dass die einzelnen atomaren magnetischen Momente nicht wechselwirken und ohne äußeres Magnetfeld durch die thermische Energie zufällig ausgerichtet werden können, so dass die Gesamtmagnetisierung sich zu Null addiert. Eine vergleichbare Situation ist bei uniaxialen magnetischen Nanopartikeln gegeben, die in einer Trägerflüssigkeit kolloidal suspendiert sind. Aufgrund ihres viel größeren magnetischen Moments $m = V_K M_S$ gegenüber den atomaren magnetischen Momenten eines Paramagneten wird von superparamagnetischen Nanopartikeln gesprochen [10]. Hat das magnetische Moment m zum äußeren Magnetfeld H_{mag} einen Winkel Ψ , ist die magnetostatische Feldenergie E_{mag} des Partikels nach Gleichung (1.7) gegeben durch

$$E_{\text{mag}} = -\mu_0 V_K M_S H_{\text{mag}} \cos(\Psi). \quad (1.15)$$

Die Richtungswahrscheinlichkeit, dass sich die Magnetisierung in einem Winkel Ψ zum äußeren Magnetfeld bei einer thermischen Energie $k_B T$ befindet, kann mit der Boltzmann-Verteilung beschrieben werden:

$$P_\Psi \sim \exp \frac{-\mu_0 V_K M_S H_{\text{mag}} \cos(\Psi)}{k_B T}. \quad (1.16)$$

Integriert über alle möglichen Winkel $\Psi = 0.. \pi$ ergibt sich der Anteil der Magnetisierung M zur Sättigungsmagnetisierung M_s in Feldrichtung zu:

$$\frac{M}{M_s} = L(\alpha) = \coth \alpha - \frac{1}{\alpha}, \quad (1.17)$$

mit $\alpha = \frac{\pi}{6} \frac{\mu_0 M_s H_{\text{mag}} d_K^3}{k_B T} = \frac{m H_{\text{mag}}}{k_B T}.$

In Abbildung 1.5(a) ist die Langevin-Funktion $L(\alpha)$ in Abhängigkeit des Kerndurchmessers d_K für verschiedene äußere Magnetfelder $\mu_0 H_{\text{mag}}$ aufgetragen. Je höher das äußere Magnetfeld ist, desto mehr kleinere Nanopartikel werden ausgerichtet. Abbildung 1.5(b) zeigt diese Eigenschaft der Langevin-Funktion $L(\alpha)$ in Abhängigkeit der Magnetisierungsflussdichte $\mu_0 H_{\text{mag}}$ für verschiedene Kerndurchmesser d_K . Für das Verfahren der Magnetrelaxometrie bedeutet dies, dass unterschiedlich große Nanopartikel mit unterschiedlicher Ausgangsamplitude an der Relaxation teilnehmen.

Bis jetzt wurden magnetische Nanopartikel betrachtet, die sich in einer Trägerflüssigkeit drehen konnten. Sind uniaxiale magnetische Nanopartikel in einer Matrix immobilisiert, kann sich ihre Magnetisierung ohne äußeres Magnetfeld nur in zwei Richtungen entlang der leichten Achse befinden. Für die Energie eines Partikels im äußeren Magnetfeld muss die Gesamtenergie aus Anisotropieenergie und magnetostatischer Energie wie im Modell von Stoner-Wohlfarth angesetzt werden (1.8) und für die Richtungswahrscheinlichkeit der Magnetisierung ergibt sich [40]:

$$P_\Psi \sim \exp \frac{KV_K \sin^2 \Theta - \mu_0 V_K M_s H_{\text{mag}} \cos(\Theta - \Phi)}{k_B T}. \quad (1.18)$$

Die Langevin-Gleichung (1.17) beschreibt superparamagnetische Nanopartikel. Erst bei tiefen Temperaturen, bei denen die Nanopartikel nicht mehr vollständig superparamagnetisch sind, ist Gleichung (1.18) zu berücksichtigen [41].

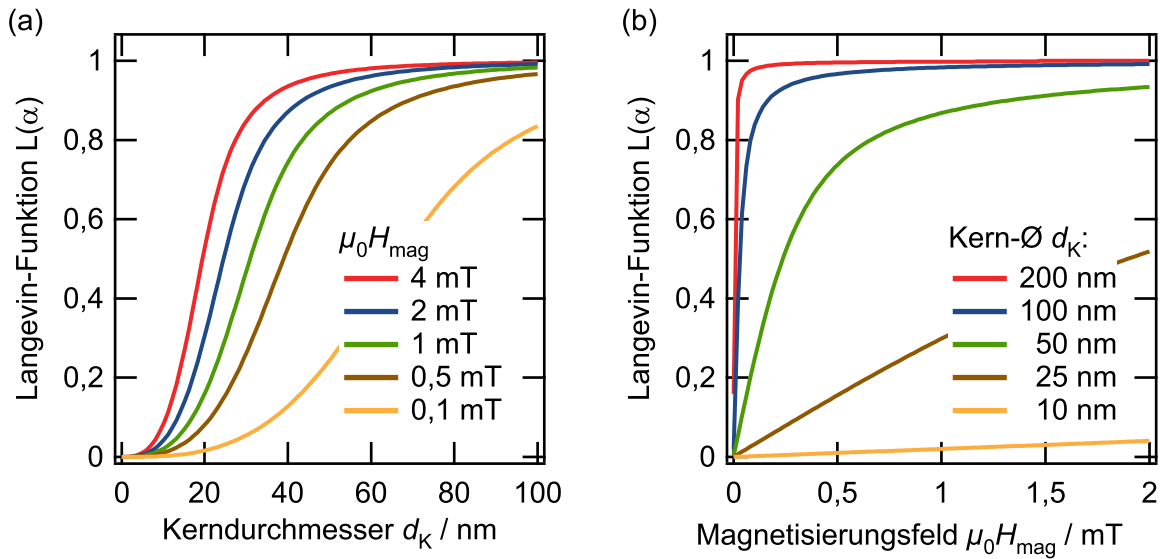


Abb. 1.5 – Langevin-Funktion $L(\alpha)$ in Abhängigkeit des (a) Kerndurchmessers d_K (b) Magnetisierungsflussdichte $\mu_0 H_{\text{mag}}$.

1.1.6 Gleichfeld-Suszeptibilität

Die Gleichfeld-Suszeptibilität χ beschreibt den Zusammenhang zwischen einem äußeren angelegten Magnetfeld H_{mag} und der Magnetisierung M einer Probe im statischen Fall:

$$M = \chi H_{\text{mag}}. \quad (1.19)$$

Zeitabhängige Effekte werden dabei nicht betrachtet. Die Magnetisierung kann aber von der magnetischen Vorgeschichte der Probe abhängen. Abbildung 1.6(a) zeigt beispielhaft die Magnetisierungskurve einer ferromagnetischen Probe. Ausgehend vom entmagnetisierten Zustand der Probe (Abbildung 1.6(a) Neukurve) steigt die Magnetisierung der Probe mit größerem äußeren Feld bis zur Sättigungsmagnetisierung M_S an. Wird das externe Feld H_{mag} aus dem Sättigungszustand bis $H_{\text{mag}} = 0$ verringert, verbleibt die Sättigungsremanenz M_r . Um das Material wieder zu entmagnetisieren, muss ein äußeres Magnetfeld H_{mag} mit der Größe der Koerzitivfeldstärke H_c in entgegengesetzter Richtung angelegt werden. Die Anfangs-Suszeptibilität ist definiert als die Steigung bei $H_{\text{mag}} = 0$

$$\chi_0 = \left[\frac{\delta M}{\delta H_{\text{mag}}} \right]_{H_{\text{mag}}=0}. \quad (1.20)$$

Die Gleichfeld-Suszeptibilität χ ist abhängig von Material, Korngröße, Temperatur (thermische Energie) und Vorgeschichte der Probe. Ist die Koerzitivfeldstärke $H_c \neq 0$, weist die Magnetisierungskurve eine Hysterese auf.

In Abbildung 1.6(b) ist die Magnetisierungskurve eines Superparamagneten gezeigt. Die statische Magnetisierungskurve weist keine Hysterese auf. Um ein Ensemble von magnetischen Nanopartikeln auf die Eigenschaft des Superparamagnetismus zu testen, können Magnetisierungskurven bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen werden. Skalieren die Magnetisierungskurven mit H_{mag}/T , liegt superparamagnetisches Verhalten vor [10]. Aus der Magnetisierungskurve kann die Größenverteilung von

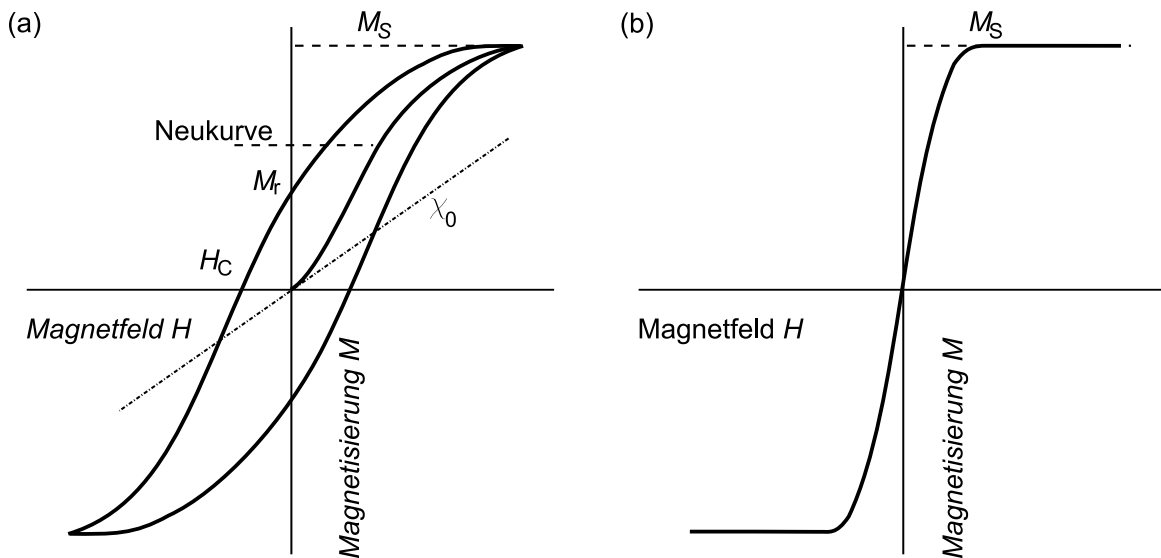


Abb. 1.6 – Magnetisierungskurve eines (a) Ferromagneten (b) Superparamagneten.

superparamagnetischen Nanopartikeln ermittelt werden. Mit der Langevin-Funktion $L(m, H, T)$ (1.17) und einer Größenverteilung $f(m)$ der magnetischen Momente der Nanopartikel kann die Magnetisierungskurve durch Integration über die einzelnen magnetischen Momente beschrieben werden:

$$\bar{m} = \int_0^\infty m f(m) L(m, H, T) dm. \quad (1.21)$$

\bar{m} ist das resultierende mittlere magnetische Moment der Probe. Mit $m = M_S V_K$ (V_K Kernvolumen, M_S mittlere Sättigungsmagnetisierung) ergibt sich die Abhängigkeit vom Kernvolumen

$$\bar{m} = M_S \int_0^\infty V_K f(V_K) L(V_K, H, T) dV_K. \quad (1.22)$$

Bei Annahme einer analytischen Verteilungsfunktion kann diese Gleichung zur Kurvenanpassung benutzt werden. Alternativ können auch Regularisierungsmethoden wie die „singular value decomposition“ (SVD) [42] oder weitere [43] angewendet werden. Die Aufnahme einer Magnetisierungskurve ist zeitintensiv, und bei Auswertung mit der Gleichung (1.22) sind keine Aussagen über die Anisotropiekonstante möglich.

1.2 Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Nanopartikel

1.2.1 Mechanismen

In diesem Abschnitt wird das dynamische Verhalten superparamagnetischer Nanopartikel in geschalteten Magnetfeldern beschrieben. Bei dieser Beschreibung werden ideal monodisperse magnetische Nanopartikel angenommen, die mit dem Stoner-Wohlfarth-Modell aus Abschnitt 1.1.4 beschrieben werden können. Eine Beschreibung von polydispersen Ferrofluiden erfolgt im Abschnitt 1.3 (Modelle zur Beschreibung von Magnetrelaxometriedaten).

Die magnetischen Momente von superparamagnetischen Nanopartikeln können nach zwei Mechanismen relaxieren. Die Relaxation der magnetischen Nanopartikel, die in einer Trägerflüssigkeit dispergiert sind, erfolgt zum einen aufgrund von thermischen Ausgleichsbewegungen, wobei sich das gesamte Nanopartikel zusammen mit seinem Magnetisierungsvektor dreht (Brown-Relaxation), und zum anderen durch die innere Drehung des Magnetisierungsvektors, wobei das Nanopartikel stationär bleibt (Néel-Relaxation). Diese Relaxationsmechanismen sind in Abbildung 1.2.1 dargestellt und werden im Folgenden erläutert.

Brown-Relaxation

Frei bewegliche Nanopartikel werden sich beim Anlegen eines äußeren Magnetfelds mit ihrer Magnetisierung in Richtung des angelegten Felds drehen. Befindet sich das Nanopartikel in Suspension, so dreht sich das gesamte Nanopartikel mit Hülle und angelagerten Molekülen in der Trägerflüssigkeit. Daher muss das hydrodynamische Partikelvolumen V_h berücksichtigt werden. Nach dem Abschalten des Felds rotieren die Nanopartikel aufgrund der Brownschen Molekularbewegung mit ihrer Magnetisierung

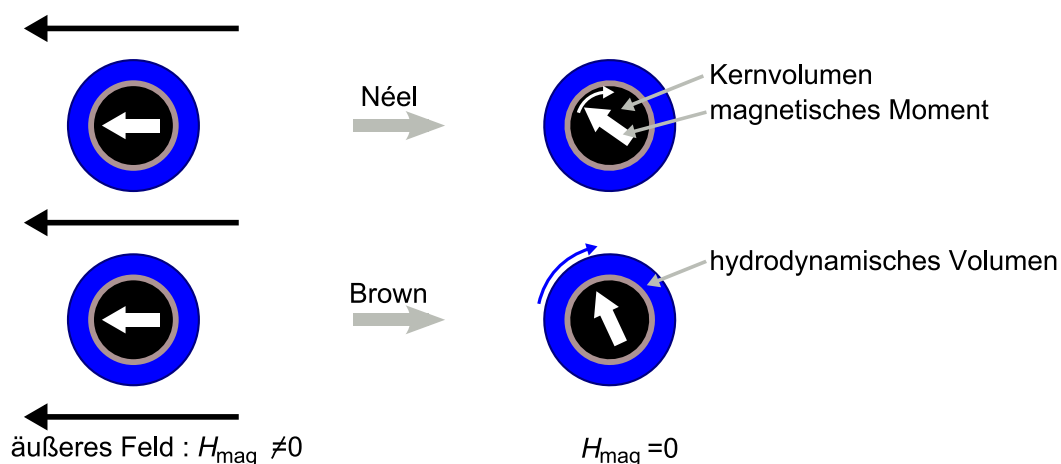


Abb. 1.7 – Schematische Darstellung der Néel- und Brown-Relaxation eines magnetischen Nanopartikels.

in die Gleichverteilung, so dass das gesamte magnetische Moment mit der Brown-Zeitkonstanten

$$\tau_{\text{Brown}} = \frac{3\eta V_h}{k_B T} \quad (1.23)$$

abklingt. Die Relaxation ist proportional zum Verhältnis der Viskosität η der Trägerflüssigkeit und des hydrodynamischen Volumens V_h zur thermischen Energie $k_B T$. Die Viskosität η der Trägerflüssigkeit wird von den magnetischen Nanoteilchen bei den in dieser Arbeit verwendeten hydrodynamischen Volumenanteilen Φ_h der Nanopartikel (kleiner als 1 %) nach der Einsteinschen Beziehung [44, 45]

$$\eta = \eta_0(1 + 2,5\Phi_h) \quad (1.24)$$

vernachlässigbar beeinflusst. Der Formfaktor 2,5 gilt für kugelförmige Partikel und η_0 ist die Viskosität der Trägerflüssigkeit ohne magnetische Nanopartikel.

Néel-Relaxation

Für uniaxiale Partikel ist die Ausrichtung der internen Magnetisierung ohne angelegtes Feld parallel oder antiparallel zur magnetisch leichten Achse. Diese Ausrichtung ist das Resultat der magnetischen Anisotropie, die durch die Kristallstruktur oder die Form vorgegeben ist und mit Hilfe der effektiven Anisotropiekonstanten K_{eff} beschrieben wird (Magnetit: $K_{\text{eff}} = 20 \text{ kJ/m}^3$). Ein Orientierungswechsel erfordert die Überwindung der Energiebarriere $\Delta E = K_{\text{eff}} V_K$. Dabei ist V_K das Kernvolumen des Partikels. Für $K_{\text{eff}} V_K \ll k_B T$ ist ein Orientierungswechsel der internen Magnetisierung in Folge der thermischen Energie möglich. Die Néel-Zeitkonstante

$$\tau_{\text{Néel}} = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{\text{eff}} V_K}{k_B T}\right) \quad (1.25)$$

beschreibt die mittlere Zeit, in der die Orientierungswechsel stattfinden. Der Vorfaktor τ_0 in Gleichung (1.25) wird von Néel mit 10^{-9} s angegeben [46, 47] und gibt an, wie oft thermische Fluktuationen die Energiebarriere zu überwinden versuchen. Er ist von der Temperatur, dem äußeren Feld und den Materialparametern wie Größe und Anisotropien abhängig. In der Literatur findet man daher Werte von τ_0 von 10^{-8} bis 10^{-12} . Die Néel-Zeitkonstante ist exponentiell abhängig vom Verhältnis der Energiebarriere $K_{\text{eff}} V_K$ zur thermischen Energie $k_B T$. Ist die Néel-Zeitkonstante $\tau_{\text{Néel}}$ im Zeitbereich des Experiments, spricht man von intrinsischem Superparamagnetismus. Mit den in dieser Arbeit aufgebauten Messgeräten kann die Magnetrelaxation vom Millisekunden- bis in den Minutenbereich beobachtet werden. Bei Raumtemperatur muss die thermische Energie etwa um den Faktor 25 größer als die Energiebarriere sein. Für magnetische Nanopartikel aus Magnetit entspricht dies einem Kerndurchmesser von ca. 16 nm. Die Blockingtemperatur T_B ist die Temperatur, oberhalb der die Magnetisierung der Partikel sich durch die thermische Energie im Zeitbereich des Experiments ändert [46].

Effektive Relaxation

Sind Néel- und Brown-Relaxation möglich, überlagern sich beide Prozesse zu einer effektiven Zeitkonstanten τ_{eff} [48, 49]:

$$\tau_{\text{eff}} = \frac{\tau_{\text{Brown}} \tau_{\text{Néel}}}{\tau_{\text{Brown}} + \tau_{\text{Néel}}} \quad (1.26)$$

Der Relaxationsmechanismus mit der kürzeren Zeitkonstante dominiert die Relaxationszeit. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Die konstanten Parameter für die Berechnung mit (1.23), (1.25) und (1.26) sind: Hüllendicke = 10 nm, $\eta = 1,5 \text{ mPa s}$, $K_{\text{eff}} = 20 \text{ kJ/m}^3$, $\tau_0 = 10^{-9} \text{ s}$, $T = 300 \text{ K}$. Für Nanopartikel unter 16 nm Kerndurchmesser dominiert die Néel-Relaxation (Punkt 1), und diese Nanopartikel werden als intrinsisch superparamagnetisch bezeichnet. Ein Nanopartikel mit einem Kerndurchmesser von $d_K = 20 \text{ nm}$ bei einer Hüllendicke von 10 nm relaxiert in der Trägerflüssigkeit schneller nach dem Brownschen Mechanismus (Punkt 2) und wird als extrinsisch superparamagnetisch bezeichnet.

Wird dasselbe Nanopartikel immobilisiert, beispielsweise durch Gefriertrocknen, kann es nicht über den Brownschen Mechanismus relaxieren, sondern nur über den

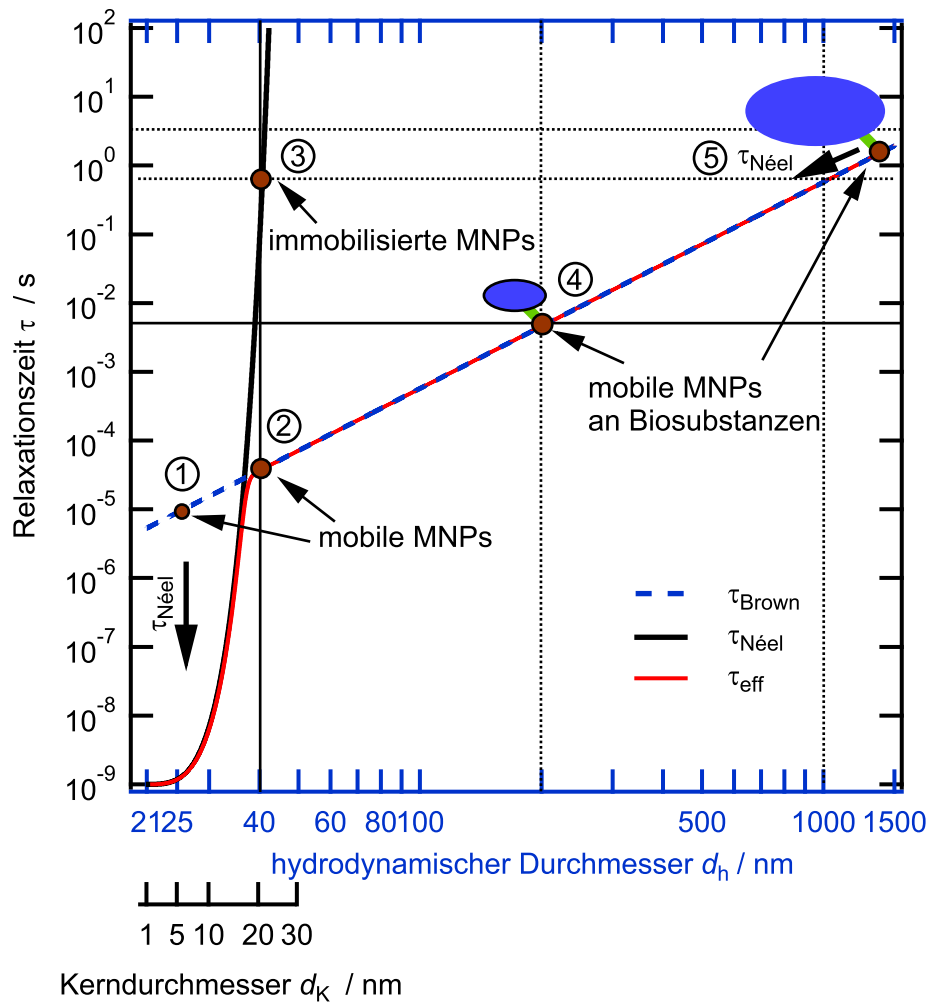


Abb. 1.8 – Brown-, Néel- und effektive Relaxationszeiten magnetischer Nanopartikel aufgetragen gegen den Kerndurchmesser und hydrodynamischen Durchmesser. Berechnet mit (1.23), (1.25) und (1.26) unter folgenden Umgebungsparametern: Hüllendicke = 10 nm, $\eta = 1,5 \text{ mPa s}$, $K_{\text{eff}} = 20 \text{ kJ/m}^3$, $\tau_0 = 10^{-9} \text{ s}$, $T = 300 \text{ K}$.

viel langsameren Néel-Mechanismus (Punkt 3). Für die hier betrachteten Magnetit-Nanopartikel ist der genaue Wert von τ_0 nicht so entscheidend, da die exponentielle Abhängigkeit der Néel-Zeitkonstanten vom Kernvolumen und der Anisotropiekonstanten für diese dominiert. Ein Unterschied von 2-3 Größenordnungen in τ_0 ändert den Kerndurchmesser nur um 2 nm.

Bindet das Nanopartikel an ein Biomolekül, vergrößert sich der hydrodynamische Durchmesser d_h und die Brownsche Relaxation verlangsamt sich (Punkt 4). Über einem kritischen hydrodynamischen Durchmesser ist die Brownsche Relaxation langsamer als die Néelsche und die Néel-Relaxation dominiert wieder (Punkt 5). Die Beweglichkeit der Nanopartikel kann über die Messung der Relaxationszeiten bestimmt und für den Nachweis von Biomolekülen verwendet werden. Um kleinste Änderungen des hydrodynamischen Durchmessers detektieren zu können, sind monodisperse Nanopartikel ideal.

1.2.2 Néel-Zeitkonstante im Magnetfeld

Eine durch ein äußeres Magnetfeld ausgerichtete interne Magnetisierung wird nach dem Ausschalten des Felds mit einer Zeitkonstanten in eine zufällige Richtung entlang der leichten Achse relaxieren.

Die Néel-Zeitkonstante (1.25) beschreibt die Zeit, mit der Umklappprozesse in uniaxialen magnetischen Nanopartikeln ohne äußeres Magnetfeld H_{mag} stattfinden. Liegt ein äußeres Magnetfeld H_{mag} an, ändert sich die Energiebarriere $K_{\text{eff}} V_K$ entsprechend des Stoner-Wohlfarth-Modells (Abschnitt 1.1.4). Die Néel-Zeitkonstante in Anwesenheit eines externen Magnetfelds H_{mag} entlang der leichten Achse eines Nanopartikels ist nach Néel gegeben durch [46]:

$$\tau_{\text{Néel,H}}(H_{\text{mag}}) = \tau_0 \exp \left[\frac{K_{\text{eff}} V_K (1 - h)^2}{k_B T} \right], \quad (1.27)$$

wobei h das reduzierte äußere Magnetfeld

$$h = \frac{H_{\text{mag}}}{H_K} \quad (1.28)$$

ist. Für $H_{\text{mag}} = 0$ geht die Zeitkonstante (1.27) in die Zeitkonstante (1.25) über. Bei zufälliger Orientierung der Nanopartikel liegt das äußere Magnetfeld nicht mehr entlang der leichten Achsen aller Nanopartikel. Der Einfluß des äußeren Felds auf die Energiebarriere $K_{\text{eff}} V_K$ kann in diesem Fall für eine effektive uniaxiale Anisotropie K_{eff} über die Gleichung (1.8) berücksichtigt werden. Ist $h \ll 1$, gilt mit Gleichung (1.10) nach Chantrell et al. [50]:

$$\tau_{\text{Néel,H}}(H_{\text{mag}}) = \tau_0 \exp \left[\frac{K_{\text{eff}} V_K}{k_B T} \left(1 - 2 \frac{H_{\text{mag}}}{H_K} (\cos \Phi + \sin \Phi) \right) \right]. \quad (1.29)$$

Ludwig et al. [51] berücksichtigen in der Néel-Zeitkonstante (1.29) zusätzlich einen quadratischen Term:

$$\tau_{\text{Néel,H}}(H_{\text{mag}}) = \tau_0 \exp \left[\frac{K_{\text{eff}} V_K}{k_B T} \left(1 - 2 \frac{H_{\text{mag}}}{H_K} (\cos \Phi + \sin \Phi) + \left(\frac{H_{\text{mag}}}{H_K} \right)^2 \right) \right]. \quad (1.30)$$

Um die Winkelabhängigkeit von Φ für weitere Rechnungen zu vereinfachen, gibt es verschiedene Ansätze. Eberbeck et al. [49] benutzten die Néel-Zeitkonstante (1.29) von Chantrell et al. [50] und mitteln über $\cos \Phi + \sin \Phi$. Sie erhalten für die Néel-Zeitkonstante:

$$\tau_{\text{Néel,H}}(H_{\text{mag}}) = \tau_0 \exp \left(1 - 0,82 \frac{H_{\text{mag}}}{H_K} \right). \quad (1.31)$$

In Ludwig et al. [51] wurde für $\cos \Phi + \sin \Phi$ ein adaptiver Faktor F eingeführt, der von der effektiven Anisotropiekonstanten abhängt:

$$F = 2,42 + 6,67 \times 10^{-5} K_{\text{eff}}/(\text{J/m}^3). \quad (1.32)$$

Er wurde mittels statistischer Versuchsplanung mit den Eckpunkten der physikalischen Parameter $\mu = (8 \text{ nm}, 20 \text{ nm})$, $\sigma = (0,2, 0,5)$, $K_{\text{eff}} = (2 \times 10^3 \text{ J/m}^3, 8 \times 10^3 \text{ J/m}^3)$ ermittelt [51]. Es ergibt sich für die Néel-Zeitkonstante folgende Abhängigkeit:

$$\tau_{\text{Néel,H}}(H_{\text{mag}}) = \tau_0 \exp \left\{ \frac{K_{\text{eff}} V_K}{k_B T} \left[1 - F \frac{H_{\text{mag}}}{H_K} + \left(\frac{H_{\text{mag}}}{H_K} \right)^2 \right] \right\}. \quad (1.33)$$

Diese wird auch in den Berechnungen dieser Arbeit angewendet. Die Néel-Zeitkonstanten dieses Abschnitts gelten für nicht wechselwirkende Nanopartikel mit uniaxialer Anisotropie.

1.3 Modelle zur Beschreibung von Magnetrelaxometriedaten

1.3.1 Momenten-Superpositions-Modell

Das magnetische Momenten-Superpositions-Modell (MSM) beschreibt den Néelschen Relaxationsprozess eines Ensembles von magnetischen Nanopartikeln unter Berücksichtigung der Größenverteilung der Kernvolumen [49, 50]. Die zeitabhängige Magnetisierung eines Ensembles von monodispersen Nanopartikeln kann durch den Magnetisierungs- und den Relaxationsprozess allgemein mit

$$M(t) = M_{\text{mag},\infty} (1 - \exp(-t_{\text{mag}}/\tau_{\text{Néel,H}})) \cdot \exp(-t/\tau_{\text{Néel}}) \quad (1.34)$$

beschrieben werden. $M_{\text{mag},\infty}$ ist die Magnetisierung nach unendlich langer Einwirkzeit $t_{\text{mag}} = \infty$ des äußeren Magnetfelds. Die folgende Exponentialfunktion beschreibt den Magnetisierungsprozess mit einer Dauer von t_{mag} und der Néel-Zeitkonstanten im Magnetfeld $\tau_{\text{Néel,H}}$. Die letzte Exponentialfunktion beschreibt den Relaxationsprozess mit der Néel-Zeitkonstanten $\tau_{\text{Néel}}$. Bei einem unendlich langen Magnetisierungsprozess richten sich die einzelnen magnetischen Momente der Nanopartikel nach der Langevin-Funktion $L(\alpha)$ (1.17) aus. Wird ein Ensemble von kugelförmigen Nanopartikeln mit einer Größenverteilung $f(d_K, \mu_K, \sigma_K)$ des Kerndurchmessers d_K angenommen, ist die Magnetisierung des Ensembles nach der Zeit t_{mag}

$$M_{\text{mag}}(t_{\text{mag}}) = M_S \int f(d_K, \mu_K, \sigma_K) \frac{\pi d_K^3}{6} L(d_K, H_{\text{mag}}, T) \left[1 - \exp\left(-\frac{t_{\text{mag}}}{\tau_{\text{Néel,H}}}\right) \right] dd_K, \quad (1.35)$$

mit M_S der Sättigungsmagnetisierung, L der Langevin-Funktion und $\tau_{\text{Néel,H}}$ der Néel-Relaxationszeit im Magnetfeld, die wiederum eine Funktion der absoluten Temperatur T , der Sättigungsmagnetisierung M_S , der effektiven Anisotropiekonstanten K_{eff} und des Kerndurchmessers d_K ist. Weiterhin ist f die Größenverteilungsdichtefunktion, hierbei wird von einer logarithmischen Normalverteilung

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma x} \exp\left(\frac{-(\ln(x) - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (1.36)$$

ausgegangen. Das Maximum des Kerndurchmessers d_{max} ist an der Stelle $\exp(\mu - \sigma^2)$. Die Annahme einer Verteilung der Kerndurchmesser und einer konstanten effektiven Anisotropiekonstanten ist gültig, wenn die Kerne unterschiedliche Volumina bei gleicher Form haben.

Nach dem Abschalten des äußeren Magnetfelds relaxiert das Ensemble von Nanopartikeln mit der Néel-Zeitkonstanten $\tau_{\text{Néel}}$ und der gesamte Prozess lässt sich mit

$$M_{\text{rel}}(t) = M_S \int f(d_K, \mu_K, \sigma_K) \frac{\pi d_K^3}{6} L(d_K, H_{\text{mag}}, T) \left[1 - \exp\left(-\frac{t_{\text{mag}}}{\tau_{\text{Néel,H}}}\right) \right] \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Néel}}}\right) dd_K \quad (1.37)$$

beschreiben [49, 52, 53].

1.3.2 Cluster-Momenten-Superpositions-Modell

Eberbeck et al. [54] haben das magnetische Momenten-Superpositions-Modell für magnetische Nanopartikel erweitert, die in einer Trägerflüssigkeit rotieren können. Mit dieser

Erweiterung ist es möglich, hydrodynamische Größenverteilungen für magnetische Nanopartikel und Agglomerate anzugeben. In dem magnetischen Momenten-Superpositions-Modell (1.37) werden die Néel-Zeitkonstanten $\tau_{\text{Néel}}$ und $\tau_{\text{Néel,H}}$ durch die effektiven Zeitkonstanten τ_{eff} und $\tau_{\text{eff,H}}$ analog zur Gleichung (1.26) ersetzt. Zusätzlich muss über den hydrodynamischen Durchmesser d_h integriert werden:

$$M_{\text{rel}}(t) = M_S \int f(d_h, \mu_h, \sigma_h) \int f(d_K, \mu_K, \sigma_K) \frac{\pi d_K^3}{6} L(d_K, H_{\text{mag}}, T) \times \left[1 - \exp\left(-\frac{t_{\text{mag}}}{\tau_{\text{eff,H}}}\right) \right] \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{eff}}}\right) dd_K dd_h. \quad (1.38)$$

Für eine Kurvenanpassung mit diesem Modell sollten zuerst die Kerneigenschaften des Ferrofluids im immobilisierten Zustand mit dem MSM (1.37) angepasst werden. Dies schränkt die Freiheitsgrade der Kurvenanpassung mit Gleichung (1.38) ein.

1.3.3 Näherungsmodelle

Das magnetische Momenten-Superpositions-Modell (1.37) beschreibt den zeitlichen Verlauf des Magnetisierungs- und Relaxationsvorgangs eines Ensembles von immobilisierten, nicht wechselwirkenden, uniaxialen Nanopartikeln als eine Überlagerung von Exponential-Funktionen. Für bestimmte Größenverteilungen der Kerndurchmesser kann der zeitliche Verlauf der Relaxationskurven genähert werden. Eine lineare logarithmische Zeitabhängigkeit der Magnetisierung ergibt sich, wenn die Verteilungsdichte der Kerndurchmesser konstant ist [35, 55]:

$$M(t) = S \ln(t_0/t) + C. \quad (1.39)$$

S ist die magnetische Viskosität und enthält Information über die Größenverteilung. Liegt eine schmale Größenverteilung vor, ist eine Abweichung vom linear logarithmischen Verhalten zu erwarten. Chantrell et al. [50] haben Gleichung (1.37) nur bis zu einem kritischen Volumen V_c integriert. Nanopartikel, die größer sind als das kritische Volumen, tragen während der Messzeit nicht zur Relaxation bei. Der Integrand wurde aufgrund der starken Abhängigkeit der Relaxationszeiten vom Volumen vereinfacht. Für den Verlauf der Relaxationskurven gilt dann ein modifiziertes logarithmisches Verhalten:

$$M(t) = B_N \ln(1 + t_c/t) + C. \quad (1.40)$$

Hier ist t_c die Zeitkonstante, die dem kritischen Volumen zugeordnet werden kann. Das Modell ist bis zu Messzeiten von t_c gültig. Die charakteristische Zeitkonstante t_c hängt von der Magnetisierungszeit t_{mag} und dem Magnetisierungsfeld H_{mag} ab. Für den Fall kleiner Magnetisierungsfelder $H_{\text{mag}}/H_k \ll 1$ haben Berkov und Kötitz [56] gezeigt, dass der Relaxationsverlauf nur von der Magnetisierungszeit t_{mag} abhängt:

$$M(t) = B_N \ln(1 + t_{\text{mag}}/t) + C. \quad (1.41)$$

1.3.4 Phänomenologische Modelle

Logarithmische Funktion

Abgeleitet aus den Näherungsmodellen für immobilisierte magnetische Nanopartikel kann allgemein der Néelsche Relaxationsverlauf über die modifizierte logarithmische

Funktion beschrieben werden:

$$B_r(t) = B_{0,N} \cdot \ln \left(1 + \frac{\tau_N}{t} \right) + B_{\text{Offset}}. \quad (1.42)$$

Dabei ist $B_{0,N}$ eine Amplitude, die bei gleichen Messbedingungen von der Konzentration des Ferrofluids abhängt. Die Zeitkonstante τ_N ist charakteristisch für das Ferrofluid und hängt bei nicht wechselwirkenden Nanopartikeln nicht von der Konzentration ab. Für schmale Größenverteilungen der logarithmischen Normalverteilung ($\sigma_K < 0,1$) liefert das magnetische Momenten-Superpositions-Modell bessere Ergebnisse der Kurvenanpassung als (1.42) [49].

Gestreckte Exponentialfunktion

Allgemein ist der Relaxationsverlauf eine Superposition aus verschiedenen exponentiellen Zerfällen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten. Ein solcher Verlauf kann phänomenologisch durch eine gestreckte Exponentialfunktion

$$B_r(t) = B_{0,B} \cdot \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_B} \right)^\beta \right] + B_{\text{Offset}} \quad (1.43)$$

beschrieben werden. Dabei ist τ_B eine charakteristische Zeitkonstante und β ein Maß für die Breite der Zeitkonstantenverteilung. Der Relaxationsverlauf von Nanopartikel-Suspensionen mit einer Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers kann durch diese Gleichung gut beschrieben werden. Die Amplitude $B_{0,B}$ ist unter gleichen Bedingungen nur von der Konzentration des Ferrofluids abhängig.

1.4 Methoden zur Charakterisierung von Ferrofluiden

Die Kenntnis der Eigenschaften von Ferrofluiden ist sowohl für Hersteller als auch für Anwender von großer Bedeutung. Jede Anwendung hat spezifische Anforderungen an das Ferrofluid. Die magnetischen Eigenschaften, wie Ferromagnetismus oder Superparamagnetismus, werden vom Kernmaterial, dessen Größe und dessen Form bestimmt. Sie müssen im Herstellungsprozess kontrolliert und definiert werden. Eine zeitliche Veränderung der magnetischen Eigenschaften des Kernmaterials wird durch eine Hülle verhindert, die den magnetischen Kern z.B. vor Oxidation schützt. Sie hat außerdem die Aufgabe, die magnetische Agglomeration der Kerne zu unterbinden, indem sie einen Mindestabstand zwischen diesen aufrecht hält. Des Weiteren muss die Hülle an die Anwendung angepasst sein. Bei *in vivo* Anwendungen dürfen die Nanopartikel in der physiologischen Umgebung nicht agglomerieren. Diese Anforderungen an die Ferrofluide können mit geeigneten Charakterisierungsmethoden überprüft werden.

Die Charakterisierungsmethoden von Ferrofluiden können in mikroskopische und integrale unterteilt werden. Bei den mikroskopischen Methoden der Rasterelektronen- (REM), Transmissionselektronen- (TEM) und der Rastersondenmikroskopie können Eigenschaften einzelner Partikel untersucht werden. Bei den integralen Methoden werden die Eigenschaften an einem Ensemble von Nanopartikeln gemessen. Nur mit diesen ist es möglich, ein Ferrofluid unter Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln und der Trägerflüssigkeit zu untersuchen. Zu den integralen Verfahren gehören z.B. die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), DC-Suszeptibilität (Magnetisierungskurve: $M(H)$), AC-Suszeptibilität ($AC-\chi$) oder Magnetrelaxationsmessungen (MRX). Der Einfluss der Probenpräparation und die messbaren Eigenschaften werden für die genannten Charakterisierungsmethoden in den folgenden Abschnitten erläutert. Eine Übersicht der während dieser Arbeit benutzten Charakterisierungsverfahren liefert Tabelle 1.1. Weitere wichtige Charakterisierungsmethoden sind die Röntgendiffraktometrie und Mössbauer-Spektroskopie, die Informationen über Materialeigenschaften und Oxidationsstufen des Eisenoxids geben [57].

Elektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronen- und Transmissionselektronenmikroskopie befindet sich die Probe in einer Vakuumkammer. Die Ferrofluide müssen daher auf geeigneten Substraten getrocknet werden. Dieser Trocknungsprozess kann die Hülle durch Schrumpfen beeinflussen, so dass bei der Rasterelektronenmikroskopie ein zu kleiner Durchmesser der Partikel gemessen wird. Ein weiteres Problem ist die Agglomeration während der Trocknung. Ein Agglomerieren während des Trocknungsprozesses kann z.B. durch Gefriertrocknung verhindert werden. Andererseits gibt die Art der Agglomeration der Nanopartikel Rückschlüsse auf magnetische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln. Sind magnetische Nanopartikel durch die Hülle ausreichend weit getrennt, so dass keine magnetische Wechselwirkung existiert, werden sich die Nanopartikel anhäufen. Besitzen die magnetischen Nanopartikel ein permanentes magnetisches Dipolmoment, reihen sie sich konzentrationsabhängig in Ketten aneinander [58].

Im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie wird bei der Transmissionselektronenmikroskopie die Probe mit dem Elektronenstrahl durchstrahlt. Dadurch werden die mag-

netischen Kerne ohne Hülle abgebildet, da der Elektronenstrahl von dem magnetischen Material der Kerne gestreut und durch das organische Hüllenmaterial transmittiert wird. Mit der hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie kann die Gitterstruktur des Kristalls aufgelöst werden und es können kristallografische Domänen identifiziert werden.

Rastersondenmikroskopie

Bei der Rastersondenmikroskopie wird ein freitragender Balken (engl. Cantilever) mit einer kleinen, spitzen Nadel am Ende über eine Probe bewegt. Dabei wird die Wechselwirkung zwischen Nadel und Probe über die Auslenkung des Cantilevers aufgezeichnet. Die Abmessung der Nadel und die Schrittweite der Bewegungen liegen im unteren Nanometerbereich, so dass sich laterale Strukturen im Nanometerbereich und Tiefenstrukturen bis in den atomaren Bereich abbilden lassen.

Bei der Rasterkraftmikroskopie (AFM, engl. atomic force microscopy) wird die atomare Wechselwirkung der Spitze und der Probe gemessen. Die abstandsabhängige Kraft auf den Cantilever wird dabei durch repulsive und anziehende Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte) je nach Abstand zur Probe beeinflusst. Aus diesen Informationen lässt sich die Topografie der Probe rekonstruieren. Es lassen sich somit Oberflächen von einzelnen magnetischen Nanopartikeln darstellen und die Größe und Form bestimmen.

Bei der Magnetkraftmikroskopie (MFM) ist die Spitze mit einer magnetischen Schicht bedeckt und die magnetischen Wechselwirkungen mit der Probe werden aufgezeichnet. Im Falle von magnetischen Nanopartikeln kann das magnetische Streufeld aufgenommen werden, welches Rückschlüsse auf die Domänenstruktur des Nanopartikels zulässt. Bei zeitlich aufgelösten Messungen kann die Schaltfrequenz gemessen werden [59].

Das Ferrofluid kann flüssig oder getrocknet auf einem glatten Substrat gemessen werden. Wird das Ferrofluid getrocknet, kann es zum Schrumpfen der Hülle bzw. zum Degradieren des magnetischen Kerns kommen. Dieses kann vermieden werden, wenn in der Trägerflüssigkeit gemessen wird.

Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS, engl. Photon Correlation Spectroscopy) ist ein weit verbreitetes Standardverfahren, um von kolloidalen Systemen die Größenverteilung zu bestimmen. Es lassen sich Größenverteilungen von Partikeln mit Größen zwischen 1 nm und 2 μm in Flüssigkeiten bestimmen. Werden die suspendierten Partikel mit einem Laserstrahl beleuchtet, streuen sie das Licht. Die Streulichtintensität wird in kurzen Zeitabständen gemessen. Aufgrund der Brownschen Bewegung der Partikel fluktuiert die Streulichtintensität in Abhängigkeit der Nahordnung der Partikel. Für kleine Partikel ändert sich die Intensitätsverteilung schneller als für größere, und durch die Analyse der Autokorrelation des Messsignals können Rückschlüsse auf die Größenverteilung der Partikel gewonnen werden.

Magnetische Gleichfeld-Suszeptibilität

Bei der DC-Suszeptibilität wird der Zusammenhang der Gleichfeld-Suszeptibilität χ zwischen einem statischen äußeren Feld H_{mag} und der magnetischen Induktion B der

Probe gemessen. Aus dem Verlauf dieser Magnetisierungskurve kann, wie in Abschnitt 1.1.6 beschrieben, die Kerngrößenverteilung berechnet werden. In temperaturabhängigen Messungen können die Blocking-Temperatur T_B und die effektive Anisotropiekonstante K_{eff} des Ferrofluids bestimmt werden. Die Proben können sowohl flüssig als auch immobilisiert gemessen werden.

Magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität

Bei der AC-Suszeptibilitätsmessung wird die Probe einem schwachen magnetischen Wechselfeld ausgesetzt. Die magnetischen Momente der Nanopartikel folgen dem äußeren Feld mit einer von der Anregungsfrequenz abhängigen Phasenverschiebung. Die komplexe Suszeptibilität beschreibt den Zusammenhang zwischen einem äußeren Magnetfeld und der Magnetisierung der Probe. Der Realteil χ' gibt den phasenrichtigen Anteil an und der Imaginärteil χ'' beschreibt den um 90° phasenverschobenen Anteil im Vergleich zur Anregungsfeldstärke. Im Debye-Modell, das für monodisperse Nanopartikel gültig ist, sind die beiden Anteile folgendermaßen definiert:

$$\chi'(\omega) = \frac{\chi_0}{1 + (\omega \cdot \tau)^2}, \quad (1.44)$$

$$\chi''(\omega) = \frac{\chi_0 \cdot \omega \cdot \tau}{1 + (\omega \cdot \tau)^2}. \quad (1.45)$$

Für polydisperse Nanopartikel haben Chung et al. [60] eine Verteilungsfunktion für den hydrodynamischen und den Kerndurchmesser berücksichtigt:

$$\chi'(\omega) = \chi_0^* \int_0^\infty f(d_h) \int_0^\infty \frac{d_K^6 \cdot f(d_K)}{1 + (\omega \cdot \tau_{\text{eff}})^2} dd_K dd_h, \quad (1.46)$$

$$\chi''(\omega) = \chi_0^* \int_0^\infty f(d_h) \int_0^\infty \frac{d_K^6 \cdot f(d_K) \cdot \omega \cdot \tau_{\text{eff}}}{1 + (\omega \cdot \tau_{\text{eff}})^2} dd_K dd_h. \quad (1.47)$$

Mit diesem Verfahren können je nach Versuchsaufbau flüssige oder immobilisierte Nanopartikel vermessen werden. Man erhält Kern- und hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel. Das Maximum des Imaginärteil (Gleichung 1.47) entspricht nicht mehr dem Maximum der Größenverteilung der Nanopartikel, wie es beim Debye-Modell für monodisperse Nanopartikel der Fall war.

Eine AC-Suszeptibilitätsmessung ist zeitaufwendig, da in einem großen Frequenzbereich (Hz bis MHz) sukzessive Messpunkte aufgenommen werden müssen.

Magnetrelaxometrie

Die Messung der Magnetrelaxation eignet sich zur schnellen Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln. In den Abschnitten 1.1, 1.2 und 1.3 wurden die theoretischen Grundlagen und Modelle vorgestellt, die zur Charakterisierung benötigt werden. Mit dem Verfahren der Magnetrelaxometrie können sowohl Kern- als auch hydrodynamische Eigenschaften der Nanopartikel gemessen werden. In dem Kapitel 4 „Charakterisierung von Ferrofluiden“ wird das Verfahren der Magnetrelaxometrie mit den anderen besprochenen Verfahren angewendet und verglichen.

Tab. 1.1 – Einordnung von mikroskopischen und integralen Charakterisierungsverfahren für Ferrofluide.

Methode	Art	Probenpräparation und Zielgröße	Gewichtung
Rasterelektronen- mikroskopie (REM)	mikr.	getrocknet Form und Größe inkl. Hülle	$\propto n$
Transmissions- elektronen- mikroskopie (TEM)	mikr.	getrocknet Form und Größe des Kerns	$\propto n$
Rasterkraft- mikroskopie (AFM)	mikr.	flüssig oder getrocknet Form und Größe inkl. Hülle	$\propto n$
Magnetkraft- mikroskopie (MFM)	mikr.	flüssig oder getrocknet magnetisches Streufeld: Domänenstruktur, Schaltfeld H_k	
Photonenkorrelations- spektroskopie (PCS)	integr.	flüssig hydrodynam. Durchmesser	$\propto V_h^2 \propto d_h^6$
DC-Suszeptibilität (M(H))	integr.	flüssig oder immobilisiert M_s , χ_0 , Hysterese, mag. Kerndurchmesser	$\propto V_K \propto d_K^3$
AC-Suszeptibilität (AC- χ)	integr.	flüssig oder immobilisiert hydrodynam. Durchmesser oder mag. Kerndurchmesser	$\propto V_h^2 \propto d_h^6$
Magnetrelaxation (MRX)	integr.	flüssig oder immobilisiert hydrodynam. Durchmesser oder mag. Kerndurchmesser	$\propto V_{K,h} \propto d_{K,h}^3$

1.5 Stand der Technik magnetischer Nanopartikel als Marker in der Bioanalytik

Analytik

Für die Analytik werden bevorzugt Eindomänenpartikel eingesetzt, da sie ein hohes magnetisches Moment besitzen. Dieses liefert ein hohes Messsignal. Zum Nachweis einer Zielsubstanz werden magnetische Nanopartikel funktionalisiert. Dabei werden Ligand-Rezeptor, DNA-Hybridisierung oder Antikörper-Antigen-Bindungssysteme benutzt. In heterogenen Nachweisen werden ungebundene von gebundenen Markern getrennt und dann das magnetische Gesamtmoment der gebundenen Marker als quantitatives Maß für den Analytgehalt gemessen [61]. In "Lab-On-Chip"-Anwendungen können die magnetischen Marker nicht nur gemessen, sondern auch gezielt mit magnetischen Gradientenfeldern bewegt werden und damit notwendige Auswaschschritte durchgeführt werden [62]. Höchstempfindlich können magnetische Marker, die an einen Analyten gebunden sind, mit SQUID-Magnetometern quantifiziert werden [63, 64].

Es existieren kommerzielle Laborgeräte, die mit magnetischen Markern biologische Tests bieten. Von der Firma MagnaBioSciences, LLC (USA) wird der Magnetic Assay Reader (MAR) vertrieben [65]. Das Verfahren verwendet superparamagnetische Nanopartikel, deren magnetisches Feld in einem heterogenen Assay ein Maß für den Analytgehalt ist.

Eine besondere Eigenschaft der auf magnetischen Markern basierenden Verfahren ist es, gebundene Marker in Anwesenheit von ungebundenen Markern messen zu können. Für die Durchführung von solchen homogenen Nachweistests existieren verschiedene Ansätze. In Flüssigphasen-Assays kann die Brownsche Rotation der Marker genutzt werden. Wenn der magnetische Marker an den Analyten koppelt, vergrößert sich sein hydrodynamisches Volumen und die Brownsche Rotation verlangsamt sich (siehe Gleichung (1.23)). Diese Änderung kann mit verschiedenen Verfahren ohne Auswaschschritte der ungebundenen Marker detektiert werden.

Über die Wechselfeld-Suszeptibilität (Abschnitt 1.4) kann auf die Relaxationszeit der Marker geschlossen werden. Ein magnetisches Wechselfeld wird an die Probe angelegt und anhand des Verlaufs der komplexen Suszeptibilität über die Frequenz können Aussagen über den Brownschen Relaxationsprozess getroffen werden. Im Imaginärteil treten Maxima bei der größten Energieaufnahme auf. Durch Veränderung des Maximums der Brownschen Relaxation kann auf biologische Bindungen an die magnetischen Nanopartikel geschlossen werden [66, 67]. Das zeitaufwendige Verfahren der Frequenzänderung kann umgangen werden, wenn nur bei der Frequenz des Maximums die Amplitudenänderung beobachtet wird [68].

Ein weiteres Verfahren ist die Messung der magnetooptischen Relaxation (MORFF, engl. magnetooptical relaxation of ferrofluids) [69, 70]. Wird das kristallografische Gitter magnetischer Nanopartikel mit einem Magnetfeld in die gleiche Richtung ausgerichtet, wird die Probe aufgrund des Cotton-Mouton-Effekts doppelbrechend. Nach dem Abschalten des Magnetfelds relaxieren die magnetischen Nanopartikel wieder in die Gleichverteilung und die Doppelbrechung verschwindet. Der Verlauf der Doppelbrechung wird optisch mit einem Laser erfasst. Mit diesem Verfahren lassen sich auch Bindungskinetiken beobachten [71].

Die Brownschen und die Néelschen Relaxationszeiten von superparamagnetischen Nanoteilchen können mit dem Verfahren der Magnetrelaxometrie schnell gemessen werden. Zur Aufnahme der Zeitsignale wurden bis jetzt höchstempfindliche SQUID-Magnetometer eingesetzt. In der Dissertation von J. Lange [6, 72] wurden vergleichende Messungen zwischen dem magnetischen Relaxationsimmunoassay (MARIA) und dem etablierten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Der MARIA wurde dort mit dem höchstempfindlichen SQUID-System der PTB [73] durchgeführt. Der Vergleich eines direkten Assays zum Nachweis von humanem IgG und einem Sandwich-Assay zum Nachweis von *Desmodus rotundus Plasminogen* (DSPA) wurde durchgeführt. Die MARIAs wurden homogen in Anwesenheit der ungebundenen Marker durchgeführt. Die Nachweisgrenzen lagen etwas höher als bei dem vergleichenden ELISA (Faktor 5-10). Der Bestimmungsbereich war jedoch bis zu einem Faktor 10 höher, wobei noch keine Sättigung im Signalverlauf zu erkennen war.

1.6 Magnetisches Relaxationsimmunoassay

Von einem Immunoassay wird gesprochen, wenn die Bindung zwischen einem Antikörper und einem Antigen (Antikörper-Generator) nachgewiesen wird. Dabei wird die hohe Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung genutzt [74]. Um das Vorhandensein eines Antikörpers oder Antigens messtechnisch nachzuweisen, können diese mit Markern ausgestattet werden. Diese Marker können z.B. Licht oder radioaktive Strahlung ausstrahlen [75]. Im Vergleich zu diesen Markern weisen superparamagnetische Nanopartikel eine Reihe von Vorteilen auf. Das magnetische Signal dieser Marker ist langzeitstabil und kann auch in lichtundurchlässigen Medien gemessen werden. Ein weiterer großer Vorteil von magnetischen Markern ist ein unterschiedliches magnetisches Verhalten im gebundenen und ungebundenen Zustand. Hiermit sind so genannte homogene Immunoassays möglich, bei denen in Anwesenheit von ungebundenen Markern gemessen wird und Auswaschschritte von ungebundenen Markern entfallen. Mit magnetischen Gradientenfeldern können die Marker bewegt und vor der Messung aufkonzentriert werden. Die Verwendung von superparamagnetischen Nanopartikeln als Marker und die Messung der Magnetrelaxation zum Nachweis von Biomolekülen wurde von Weitschies et al. [2] vorgeschlagen.

1.6.1 Prinzip und Durchführung

In Abbildung 1.9 ist der Messablauf eines magnetischen Relaxationsimmunoassays für ein homogenes Assay gezeigt. Es werden Nanopartikel eingesetzt, deren Brownsche Relaxationszeit kürzer als die Néelsche ist. Nach der Inkubation des Analyten mit den superparamagnetischen Markern sind die magnetischen Momente durch Brownsche und

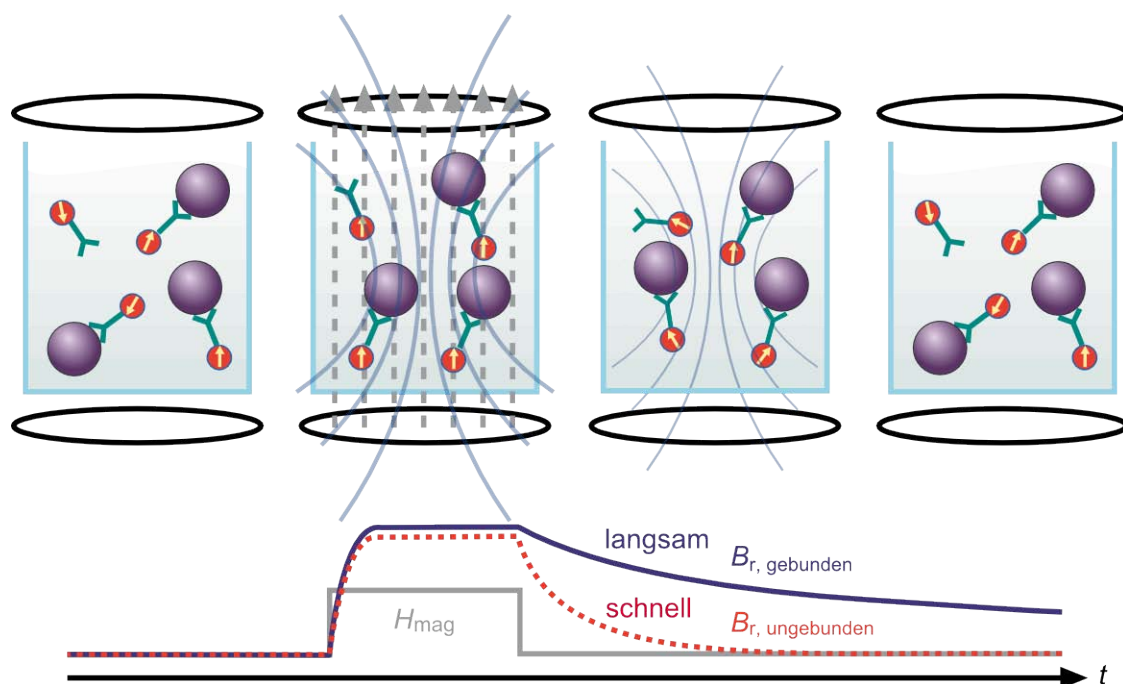


Abb. 1.9 – Schematischer Messablauf eines magnetischen Relaxationsimmunoassays.

Néelsche Rotationsprozesse zufällig verteilt. Die magnetischen Momente addieren sich zu einem effektiven Nullfeld, und außerhalb des Probengefäßes wird kein Streufeld der Probe gemessen. Dann werden die magnetischen Momente der superparamagnetischen Nanopartikel in einem äußeren magnetischen Feld H_{mag} ausgerichtet. Die Dauer t_{mag} während der das Feld angelegt wird, liegt im Sekundenbereich bei einer magnetischen Feldstärke von bis zu 3000 A/m [3]. Durch die konstruktive Überlagerung der einzelnen Momente entsteht ein Streufeld um das Probengefäß. Nach dem Abschalten des äußeren Felds relaxieren die magnetischen Momente des Ensembles von Nanopartikeln durch die thermische Energie in eine Gleichverteilung. Wie zu Beginn ist kein Streufeld messbar. Ungebundene Nanopartikel relaxieren schnell nach dem Brownschen Prozess. An Analyten gebundene Nanopartikel relaxieren aufgrund des größeren hydrodynamischen Durchmessers langsamer. Überschreitet der hydrodynamische Durchmesser eine Größe von etwa 5 μm ist der Brownsche Prozess so langsam, dass der Néelsche Mechanismus das Signal dominiert. Ein Wechsel vom Brownschen zum Néelschen Prozess kann gezielt bei einem Festphasenassay genutzt werden, bei dem die Analyten und die Nanopartikel an die Gefäßwand gebunden werden. Der gesamte Messablauf einer Messung ist nach ca. 5 Sekunden abgeschlossen. Das Streufeld der Relaxation wird mit höchstempfindlichen Magnetfeldsensoren gemessen, und aus den aufgenommenen Relaxationsdaten kann der Analytgehalt bestimmt werden.

1.6.2 Auswertung von Magnetrelaxationsdaten

Die Auswertung eines magnetischen Relaxationsimmunoassays basiert auf den Modellen aus Kapitel 1.3. Zur Auswertung der gemessenen Relaxationskurven wird eine Kurvenanpassung der Modelle durchgeführt. Die Experimente dieser Arbeit wurden mit der entwickelten Software zur Datenauswertung ausgewertet, die in Kapitel 2.3 beschrieben wird.

Für Bindungsnachweise, bei denen die Bindung an einen Analyten den Wechsel vom Brownschen zum Néelschen Mechanismus bedingt, kann der Anteil an gebundenen Nanopartikeln durch Kurvenanpassung der Relaxationsdaten mit der Superposition der phänomenologischen Gleichungen (1.43) und (1.42) für mobile und immobilisierte Nanopartikel ermittelt werden:

$$B_r(t) = B_{0,B} \cdot \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_B} \right)^\beta \right] + B_{0,N} \cdot \ln \left(1 + \frac{\tau_N}{t} \right) + B_{\text{Offset}} . \quad (1.48)$$

Dabei sind die Zeitkonstanten τ_B und τ_N sowie der Parameter β charakteristisch für das Ferrofluid. Um die Anzahl der Kurvenanpassungsparameter zu reduzieren, werden sie aus Referenzproben bestimmt. Die Referenzproben haben die gleiche Menge an Nanopartikeln wie die zu analysierenden Proben im Nachweistest, so dass der Gehalt an immobilisierten und mobilen Nanopartikeln aus den Relaxationsamplituden $B_{0,B}$ und $B_{0,N}$ auf die jeweilige Referenzprobe bezogen werden kann. Aus einer immobilisierten Referenzprobe werden die Parameter $B_{0,N}$ und τ_N mit einer Kurvenanpassung (Gleichung 1.42) ermittelt:

$$B_r(t) = B_{\text{ref,immobilisiert}} \cdot \ln \left(1 + \frac{\tau_{\text{ref,immobilisiert}}}{t} \right) + B_{\text{Offset}} . \quad (1.49)$$

Die Größe der Amplitude $B_{\text{ref,immobilisiert}}$ entspricht einer Probe mit vollständig immobilisierten Nanopartikeln. Die Immobilisierung der Nanopartikel kann durch Bindung an eine feste Phase oder wie in Kapitel 5.3 an einen großen Analyten erfolgen. In Kapitel 5.5 erfolgt die Immobilisierung der Nanopartikel durch mechanische Fixierung.

An einer flüssigen Referenzprobe werden die Parameter $B_{0,B}$, τ_B und β bestimmt:

$$B_r(t) = B_{\text{ref,mobil}} \cdot \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_{\text{ref,mobil}}} \right)^\beta \right] + B_{\text{Offset}} . \quad (1.50)$$

Die Größe der Amplitude $B_{\text{ref,ungebunden}}$ entspricht bei der flüssigen Referenzprobe vollständig ungebundenen Nanopartikeln. Der Parameter B_{Offset} in Gleichung (1.48) berücksichtigt die Unsicherheit des Offsets bei der magnetischen Flussdichtemessung. Die besten Ergebnisse werden erreicht, wenn der Offset B_{Offset} bekannt ist oder nicht vorhanden ist. Aufgrund der Messung einer Relaxation kann der Offset leicht bestimmt werden, wenn das Messsignal innerhalb der Messzeit vollständig relaxiert. Die Zuverlässigkeit dieser Auswertung wird im Kapitel 3.4 „Untersuchungen für die Methodvalidierung eines Bindungsnachweises“ und im Kapitel 5 „Anwendung“ untersucht.

1.6.3 Anforderungen an ein Messsystem

Für die Messung der Magnetrelaxation von magnetischen Nanopartikeln wird ein äußeres Magnetfeld benötigt, das die Probe aufmagnetisiert, und empfindliche Magnetfeldsensoren, die das magnetische Signal der Probe aufzeichnen. In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Voraussetzungen besprochen, die im nächsten Kapitel „Entwicklung der Messsysteme“ beim Bau der Messsysteme beachtet wurden. In dieser Arbeit soll ein robustes und zuverlässiges Messsystem aufgebaut werden, das eine Messung der Magnetrelaxation in Probengefäßen mit einem Inhalt von bis zu 300 μL (Vial (Gefäß) einer 96-Mikrotiterplatte) erlaubt. Es soll ein System entwickelt werden, das das Potential hat, zu einem Laborgerät weiterentwickelt zu werden.

Das äußere Magnetfeld soll mit Luftspulen erzeugt werden. Bei der Geometrie der Spule ist darauf zu achten, dass die Probe mit einem homogenen Magnetfeld aufmagnetisiert wird, um gleiche Bedingungen für alle Nanopartikel der Probe zu gewährleisten. Um die Voraussetzung eines ideal sprungförmigen An- und Abschaltens zur Auswertung der Magnetrelaxationsdaten mit den Relaxationsmodellen (Gleichungen (1.37) und (1.38)) zu erfüllen, muss das Magnetfeld so schnell wie möglich geschaltet werden. Typische Abschaltzeiten vorhandener MRX-Systeme sind einige 10 μs [73]. Außerdem muss ein konstantes Magnetfeld während des Magnetisierungsvorgangs gewährleistet sein.

Die Messung der Magnetrelaxation erfolgt über das Streufeld im Außenbereich der Probe und ist sehr anspruchsvoll. Das Magnetfeld eines magnetischen Dipols nimmt mit der dritten Potenz $\vec{B} \sim \vec{m}/r^3$ vom Abstand r ab [76]. Für ein Nanopartikel aus Magnetit mit einem Durchmesser von 20 nm entspricht dies in einem Abstand von 50 nm einer abgeschätzten magnetischen Flussdichte im Attotesla-Bereich. Um kleinste Mengen an magnetischen Nanopartikeln zu messen, müssen empfindliche Magnetfeldsensoren eingesetzt werden. Sie müssen eine Bandbreite von einigen kHz besitzen, um die schnellen Relaxationsvorgänge zu detektieren und sollten für ein Laborgerät robust

und wartungsfrei sein. Für diese Arbeit wurden Fluxgate-Sensoren ausgewählt, da sie unter den zur Zeit verfügbaren Sensoren die besten Sensoreigenschaften und die einfachste Handhabung bei Raumtemperaturbetrieb bieten. Bis jetzt wurden hauptsächlich SQUID-Sensoren eingesetzt [73]. Im Gegensatz hierzu bieten die Fluxgate-Sensoren die Möglichkeit, während des gesamten Messablaufs das Streufeld der Probe zu messen. Hierdurch sind mehr Informationen zur Charakterisierung der magnetischen Nanopartikel verfügbar. Eine zusätzliche Information ist auch die absolute Größe des gemessenen Magnetfelds. Im nächsten Abschnitt werden die Eigenschaften ausgewählter Sensoren beschrieben, mit denen die Magnetrelaxation gemessen werden kann.

1.6.4 Magnetfeldsensoren

In diesem Abschnitt werden Magnetfeldsensoren vorgestellt, die zur Messung von magnetischen Nanopartikeln eingesetzt werden können. Bis auf die SQUID-Sensoren arbeiten alle im Weiteren beschriebenen Sensoren bei Raumtemperatur. Die Rauschdaten und Empfindlichkeiten ausgewählter höchstempfindlicher Magnetfeldsensoren werden in [77] verglichen.

SQUID-Sensoren

Die rauschärmsten, gekühlten Magnetfeldsensoren bei kleinem Sensorvolumen sind supraleitende Quanteninterferometer (SQUID, engl. Superconducting Quantum Interference Device). Sie werden mit Dünnschichttechnologie gefertigt. Ihre Funktionsweise beruht auf der Flussquantisierung und den Josephson-Effekten in einem supraleitenden Material und ist von Clarke et al. [78] beschrieben. Sind die Sensoren aus Tieftemperatur-Supraleitern hergestellt, müssen sie zum Betrieb mit flüssigem Helium ($T = 4$ K) gekühlt werden. Bei Hochtemperatur-Supraleiter-Material ist eine Kühlung mit flüssigem Stickstoff ($T = 77$ K) ausreichend. Die untere Rauschgrenze liegt für Tieftemperatur-SQUIDs unter $1 \text{ fT}/\sqrt{\text{Hz}}$ und bei Hochtemperatur-SQUIDs bei 10 fT [77]. Die Messbandbreite liegt zwischen 0 Hz bis einigen MHz. Ohne Referenzsensoren können mit ihnen nur relative Feldänderungen gemessen werden. Für die Messung der Magnetrelaxation werden von verschiedenen Gruppen Tieftemperatur-SQUIDs [73, 79] oder Hochtemperatur-SQUIDs [80–82] eingesetzt. Der Betrieb eines SQUID-Systems ist aufgrund der Handhabung und der Kühlung aufwendig und teuer.

Fluxgate-Sensoren

Von den Raumtemperatursensoren haben Fluxgate-Sensoren zur Zeit die besten Rauscheigenschaften. Hinnrichs et al. [83] haben Flussdichterauschen von $2,1 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ bei 1 Hz und $390 \text{ fT}/\sqrt{\text{Hz}}$ bei 1 kHz erreicht. Ihre Bandbreite beträgt im Allgemeinen wenige kHz. Ein Fluxgate-Sensor besteht aus einem weichmagnetischen Kern, der mit einer Anregungsspule und einer Sekundärspule umwickelt ist. Die Anregungsspule treibt den Kern periodisch und symmetrisch in Sättigung. Ohne äußeres Magnetfeld enthält die Induktionsspannung der Sekundärspule nur ungerade harmonische Frequenzen der Anregungsfrequenz. Wird ein zu messendes magnetisches Feld überlagert, wird der Kern asymmetrisch in Sättigung gebracht, und in der Induktionsspannung sind gerade harmonische Frequenzen der Anregungsfrequenz vorhanden. Die Amplituden der

harmonischen Frequenzen sind proportional zum äußeren Magnetfeld. Kommerzielle Fluxgate-Sensoren haben ein weißes Flussdichterauschen von wenigen $\text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$.

Giant Magneto-Impedance Sensoren

Die starke Abhängigkeit der Impedanz amorpher weichmagnetischer dünner Drähte oder dünner Schichten von kleinen Magnetfeldern wird Riesen-Magnetoimpedanz-Effekt (GMI, engl. Giant Magneto-Impedance) genannt [84]. Für einen Sensor reicht im einfachsten Aufbau ein geeigneter weichmagnetischer Draht aus. Dieser wird resonant mit einem Wechselstrom betrieben [85]. In [86] wurde mit diesem Sensorprinzip ein weißes Rauschen von $3,2 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ bei 1 kHz gemessen. Für Magnetrelaxationsmessungen sind sie wegen ihrer Bandbreite von 0 Hz bis zu einigen 100 kHz interessant. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Dolabdjian am GREYC der Universität Caen wurden GMI-Sensoren zur Messung der Relaxation superparamagnetischer Nanopartikel verwendet [87]. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus haben sie ein großes Potential für kommerzielle Anwendungen.

Magnetoresistive Sensoren

Magnetoresistive Sensoren ändern in Abhängigkeit eines externen Magnetfelds ihren Gleichstromwiderstand. Aufgrund unterschiedlicher physikalischer Effekte und Größen der Widerstandsänderung unterscheidet man den anisotropen Magnetowiderstand (AMR, engl. anisotropic magnetoresistance), Riesenmagnetowiderstand (GMR, engl. giant magnetoresistance), magnetischen Tunnelwiderstand (TMR, engl. Tunneling Magnetoresistance) und weitere [88]. Die besten GMR-Sensoren erreichen ein Flussdichterauschen von $\text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ im weißen Frequenzbereich. Im niederfrequenten Bereich sind sie Fluxgate-Sensoren unterlegen [89]. Beste kommerzielle GMR-Sensoren erreichen ein Flussdichterauschen von $100 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ [90]. Ihr Aufbau besteht aus magnetischen und nicht magnetischen, dünnen Schichten. Sie können auf einer kleinen Fläche im Mikrometer-Bereich hergestellt werden. Dies ermöglicht es, sie auf Biochips zu integrieren, da dort die magnetischen Nanopartikel in unmittelbarer Nähe mit einem hohen Streufeld gemessen werden können [91].

2

Entwicklung der Messsysteme

Nachdem das Messverfahren und die Anforderungen an ein Messsystem in Abschnitt 1.6 beschrieben wurden, wird in diesem Kapitel der Messaufbau des ersten in dieser Arbeit entwickelten MRX-Systems ausführlich beschrieben. Dabei wird auf die Anforderungen an die einzelnen Komponenten und deren Realisierung eingegangen. Dieser Messaufbau wird im Weiteren als MRX-Forschungssystem bezeichnet. Aufgrund der Erfahrungen mit dem MRX-Forschungssystem konnte ein kleines System (MRX-Analyzer) für den Labortisch in einem 19"-Gehäuse entwickelt werden. Dieser Aufbau ermöglicht es, magnetische Relaxationsmessungen mit einem kleinen Gerät in einer Laborumgebung durchzuführen. Um die Messdaten der MRX-Systeme auszuwerten, wurde eine umfangreiche Software entwickelt. Die Möglichkeiten dieser Software werden im letzten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben.

2.1 MRX-Forschungssystem

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das MRX-Forschungssystem mit einem Fluxgate betrieben [92, 93]. Im Folgenden wird das weiter entwickelte System mit differentieller Anordnung zweier Fluxgate-Magnetometer beschrieben. Diese Anordnung bietet wesentliche Vorteile wie Störfeldkompensation und höhere Signalstärken [94]. Das System ist so aufgebaut, dass auch SQUID-Magnetometer zur Aufnahme des Relaxationssignals benutzt werden können [95]. Diese Möglichkeit wurde zu Gunsten der neuen Anwendung mit Fluxgate-Magnetometern nicht weiter verfolgt. Fluxgate-Magnetometer sind momentan die bei Raumtemperatur empfindlichsten Magnetfeldsensoren mit kleinem Sensorvolumen für magnetische Gleichfelder [77]. Sie erlauben es, ein robustes und kostengünstiges System aufzubauen.

2.1.1 Spule und Spulenelektronik

Spule

Zum Erzeugen des äußeren Magnetfelds wurde eine orthogonale 3-achsige Spule in Helmholtz-Geometrie konstruiert. Diese erlaubt es, einen Magnetfeldvektor in beliebiger Raumrichtung anzulegen. Abbildung 2.1 zeigt das aufgebaute Spulensystem mit einem verstellbaren Standfuß. Mit Hilfe des Standfußes kann die Spule um ihren Mittelpunkt gedreht und verkippt werden, um in äußeren statischen magnetischen Feldern ausgerichtet werden zu können. Die Höhe des gesamten Spulensystems beträgt 45,5 cm. Die Spule wurde so konstruiert, dass der Homogenitätsbereich des Magnetfelds im Inneren für Messungen mit einem HT_c -SQUID-Magnetometer [96] ausgelegt ist. Werden alle drei Spulen mit der gleichen Magnetfeldstärke betrieben, ergibt sich die maximale Inhomogenität für einen Quader der Kantenlänge 1 cm in z-Richtung zu 34 ppm. Für einen Quader der Kantenlänge 2 cm beträgt diese noch 550 ppm. Bei der Messung mit einem SQUID-Magnetometer kann mit dem Spulensystem ein Magnetfeldvektor elektronisch eingestellt werden, der möglichst parallel zur sensitiven Fläche des SQUID-Magnetometers liegt. Dann wird nur noch ein geringer Teil des Magnetfeldvektors vom Sensor detektiert [95]. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass kein störender magnetischer Fluss in das supraleitende Material des Magnetometers eindringt und der Dynamikbereich der SQUID-Elektronik nicht überschritten wird. Der Homogenitätsbereich gewährleistet eine gleichmäßige Aufmagnetisierung der Probe im Mittelpunkt des Spulensystems. Für Relaxationsmessungen mit Fluxgate-Magnetometern wird nur die kleinere Spule 1 benutzt.

In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Daten der drei Helmholtz-Spulen zusammengefasst.

Tab. 2.1 – Technische Daten der Helmholtz-Spulen.

	Spule 1	Spule 2	Spule 3
mittlerer Radius in mm	96,0	108,6	121,2
Anzahl Windungen je Spulenhälfte	60	56	52
Spulenkonstante in mT/A	0,56	0,46	0,39
Induktivität je Spulenhälfte in mH	1,39	1,41	1,38
Gegeninduktivität in mH	0,17	0,17	0,16
Helmholtz-Induktivität in mH	3,12	3,15	3,09
Gleichstromwiderstand in Ω	1,57	1,65	1,71

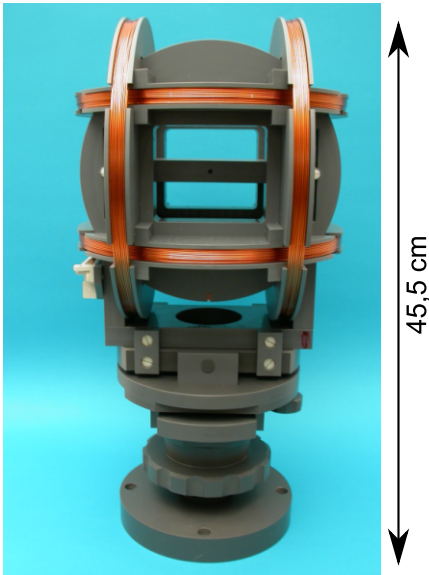


Abb. 2.1 – Fotografie des orthogonalen 3-achsigen Helmholtz-Spulensystems mit dreh- und verkippbarem Standfuß um den Mittelpunkt der Spulen.

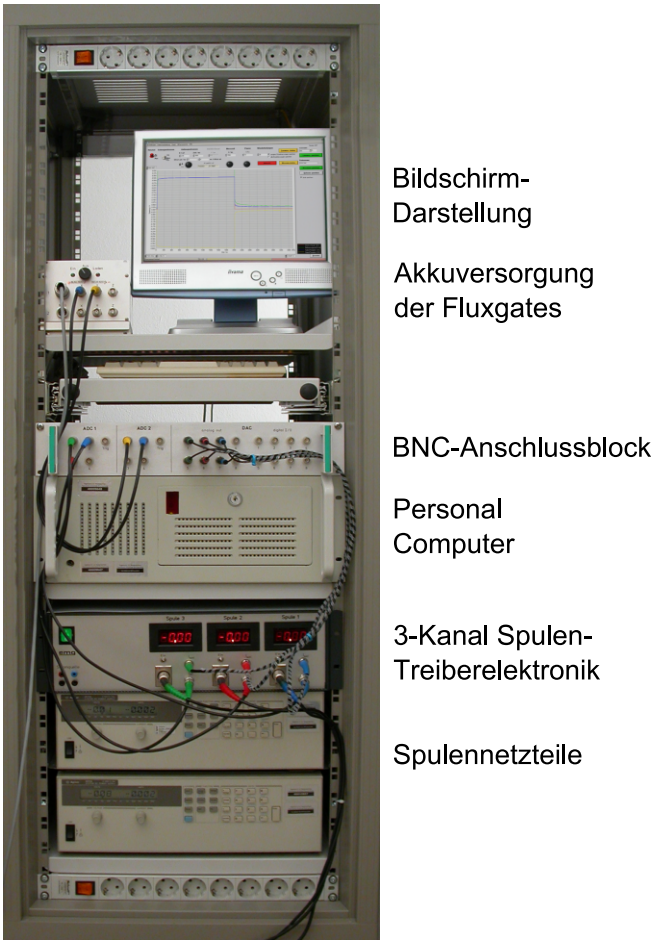


Abb. 2.2 – Fotografie der Messelektronik mit Spulenansteuerung und Messwertaufnahme.

Spulenelektronik

In Abbildung 2.2 ist der Aufbau für die Messwertaufnahme und Versuchssteuerung gezeigt. Alle Komponenten befinden sich in einem 19"-Schrank. Der Strom für die drei Spulen wird von zwei Gleichspannungs-Netzteilen (Agilent 6674A 60 V/35 A und 6675A 120 V/18 A) geliefert, um diese negativ und positiv ansteuern zu können. Darüber befinden sich die Spulen-Treiberelektroniken für die drei Spulen. Diese haben die Aufgabe, den über eine vorgegebene Soll-Spannung des Messrechners eingestellten Strom in den Spulen einzustellen und konstant zu halten. Außerdem hat die Spulen-Treiberelektronik die Aufgabe, das Magnetfeld zum Magnetisieren der Probe zu schalten. Des Weiteren befinden sich der Messrechner und die Stromversorgung der Fluxgate-Sensoren in dem 19"-Schrank.

In Abbildung 2.3 ist das Prinzip der Spulenansteuerung gezeigt. Ein Personal Computer (PC) gibt über die Digital-Analog-Umsetzer-Karte NI PCI 6733 von National Instruments mittels einer Spannung eine Rampenform vor. Die Spulen-Treiberelektronik setzt die Sollspannung in einen geregelten Strom durch die Spule um. Das Magnetfeld muss über eine Luftspule mit einstellbarer Feldstärke über längere Zeit stabil aufrecht erhalten werden. Die Magnetfelder sollen dabei sprunghaft geschaltet werden. Auch wenn beim bisherigen System die Bandbreite der Fluxgates von 3 kHz die Datenaufnahme frühestens nach 300 μs erlaubt, ist ein sprunghaftes Schalten notwendig, da dies für die Relaxationsmodelle (Kapitel 1.3) vorausgesetzt wird.

Beim Einschalten wirkt die induzierte Spannung der Spule $U_{\text{ind}} = -L \cdot \dot{I}$ der Versorgungsspannung U_0 entgegen und verursacht einen abgeflachten Stromanstieg $I(t) = (U_0/R) \cdot (1 - e^{-tR/L})$. Ein schneller Stromanstieg kann mit einer anfänglich höheren Versorgungsspannung erreicht werden. Nach dem Abschalten wirkt die in der Luftspule gespeicherte magnetische Energie als elektromotorische Kraft. Nach der Lenzschen Regel fließt der Strom in der Spule mit gleicher Richtung wie vor dem Ausschalten weiter und eine Induktionsspannung wird aufgebaut. Je größer diese Induktionsspannung werden kann, desto größer ist der Stromfluss [97]. Die magnetische Energie wird über den Strom in einem Lastwiderstand in Wärme gewandelt.

Abbildung 2.4 zeigt ein schematisches Bild der Spulenelektronik. Ein Operationsverstärker (OPV) übernimmt die Regelung des Stroms durch die Spule. Er regelt die Gate-Source-Spannung eines Leistungs-Feldeffekt-Transistors (Power-FET), so dass ein Strom von der Versorgungsspannung $U_0 = -25\text{ V}$ über den Power-FET durch die Spule L fließen kann. Der Ist-Wert des Stroms wird über den Sourcewiderstand am Power-FET abgegriffen und liegt am invertierenden Eingang des OPV an. Der Soll-Wert des Stroms wird vom PC über eine Digital-Analog-Umsetzer-Karte auf den nicht invertierenden Eingang des OPV angelegt. Die Schaltzeiten von linearen Rampen hängen

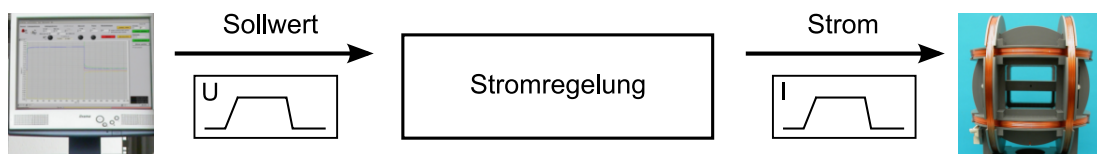


Abb. 2.3 – Prinzipskizze der Spulenansteuerung.

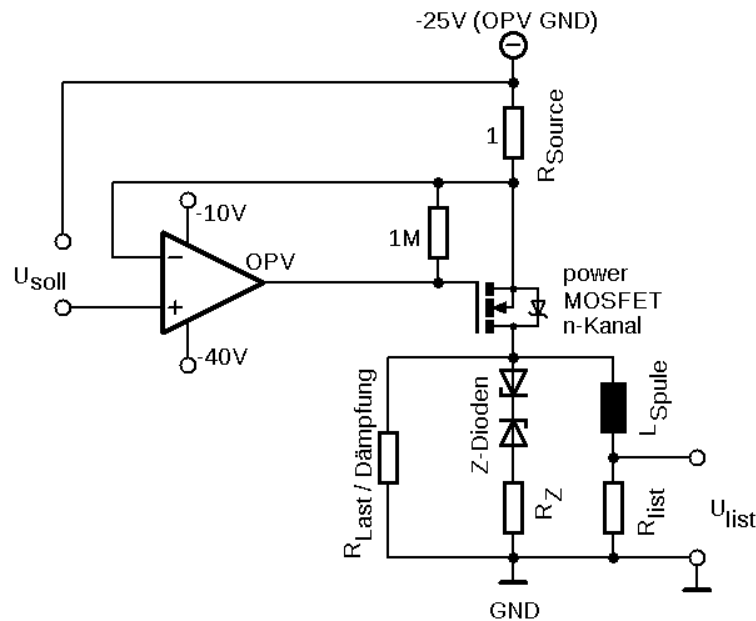


Abb. 2.4 – Skizze der Spulenelektronik.

beim Einschalten von der Versorgungsspannung $U_0 = -25\text{ V}$ und beim Ausschalten von der möglichen Induktionsspannung im Ausschaltkreis der Spule ab. Der Ausschaltkreis der Spule besteht aus der Spule L mit dem Serienwiderstand R_{list} , dem Lastwiderstand $R_{\text{Last}} = 560\ \Omega$, dem Begrenzungswiderstand $R_Z = 5\ \Omega$ und den antiseriell verschalteten Zener-Dioden.

Nach dem Abschalten begrenzen die Zener-Dioden die Induktionsspannung der Spule auf 180 V (kurz unter der Zener-Spannung der Freilaufdiode im Power-FET von 200 V). Die magnetische Energie der Spule wird im Lastwiderstand R_{Last} in Wärme umgewandelt. Der Lastwiderstand R_{Last} verhindert ein Nachschwingen des Spulenstroms. Er ist an die Spuleninduktivität angepasst. Mit dieser Schaltung ist es möglich, die Luftspule L mit 3,20 mH in 500 μs anzuschalten und in 80 μs auszuschalten. Der aktuelle Spulenstrom wird über den Messwiderstand R_{list} gemessen, dessen Widerstandswert durch großzügige Dimensionierung seiner Leistungsaufnahme und eines Kühlkörpers konstant gehalten wird.

2.1.2 Messwertaufnahme

Messaufnehmer

Zur Messwertaufnahme des Streufelds einer Probe werden zwei Fluxgate-Magnetometer benutzt. Als Fluxgate-Magnetometer kommen kommerzielle Sensoren MAG-3IE der Firma Bartington zum Einsatz. Sie haben eine Dynamik von $\pm 100\ \mu\text{T}$ bei einer Bandbreite von 3 kHz. Das weiße Rauschen beträgt $3\ \text{pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ [98]. Die Anordnung der Fluxgate-Magnetometer relativ zur Probe ist in Abbildung 2.5(a) schematisch gezeigt. Die Fluxgates sind mit ihrer empfindlichen Achse senkrecht zum externen Magnetfeld H_{mag} angeordnet, um dieses nicht zu detektieren. Externe homogene Störfelder koppeln

in die beiden Fluxgate-Magnetometer gleichsinnig ein, so dass diese bei Differenzbildung der beiden Fluxgate-Signale unterdrückt werden. Da die Fluxgate-Magnetometer nicht perfekt parallel ausgerichtet werden können, existiert senkrecht zu ihrer empfindlichen Achse ein kleiner Winkelbereich, in dem externe Störungen gegensinnig einkoppeln. Dieser kleine Anteil wird bei der Differenz verstärkt. Das durch das externe Feld hervorgerufene Dipolfeld der Probe koppelt gegensinnig in die Fluxgate-Magnetometer ein und wird bei der Differenz bis zu einem Faktor 2 vergrößert. Das Rauschen vergrößert sich dabei um den Faktor $\sqrt{2}$, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis um den Faktor $\sqrt{2}$ vergrößert wird. In Abbildung 2.6 ist die Differenzbildung einer Relaxationsmessung der beiden Fluxgate-Signale F1 und F2 in unabgeschirmter Umgebung gezeigt. Die 50 Hz Netzstörungen werden bei der Differenzbildung um den Faktor 10 unterdrückt und das Signal verdoppelt sich. In Abbildung 2.5(b) ist eine Fotografie dieser Messeinheit dargestellt. Zu sehen sind die beiden Träger-Gehäuse der Fluxgate-Magnetometer um die Probe. Diese können mit jeweils zwei Justierschrauben verkippt und mit einer unteren Schraube in Längsrichtung verschoben werden. Die Verkipfung dient dazu, die Fluxgate-Magnetometer individuell im externen Magnetfeld H_{mag} abzugleichen und die Verschiebung in Längsrichtung gewährleistet eine optimale Position der Fluxgates zur Probe. Nach dem Einstellen der Schrauben wird der Träger mit einer Abdeckplatte verschraubt, die die Position der Fluxgate-Magnetometer fixiert und ein Loch für den Probenwechsel besitzt (nicht gezeigt). Der gesamte Träger ist aus Polyvinylchlorid (PVC) gefertigt, während die Schrauben mit Feingewinde aus Polyetheretherketon (PEEK) hergestellt worden sind. Wegen der herstellerseitigen Fertigungstoleranz sind die Fluxgate-Magnetometer in ihrem Gehäuse nicht exakt positioniert. Die im Datenblatt angegebene, einbaubedingte Verkippungsunsicherheit von 3° [99] konnte mit dem 3-achsigen Helmholtz-Spulensystem nachvollzogen werden [96]. Zusätzlich wurde

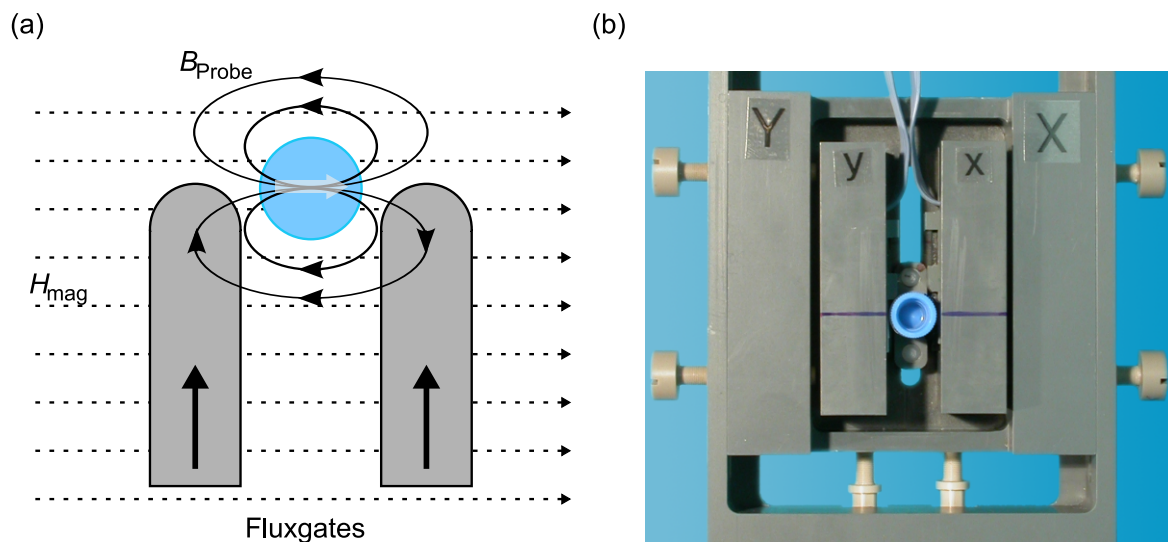


Abb. 2.5 – (a) Differentielle Fluxgate-Anordnung mit Probe. (b) Fotografie der Messeinheit mit Probe (ohne Abdeckung).

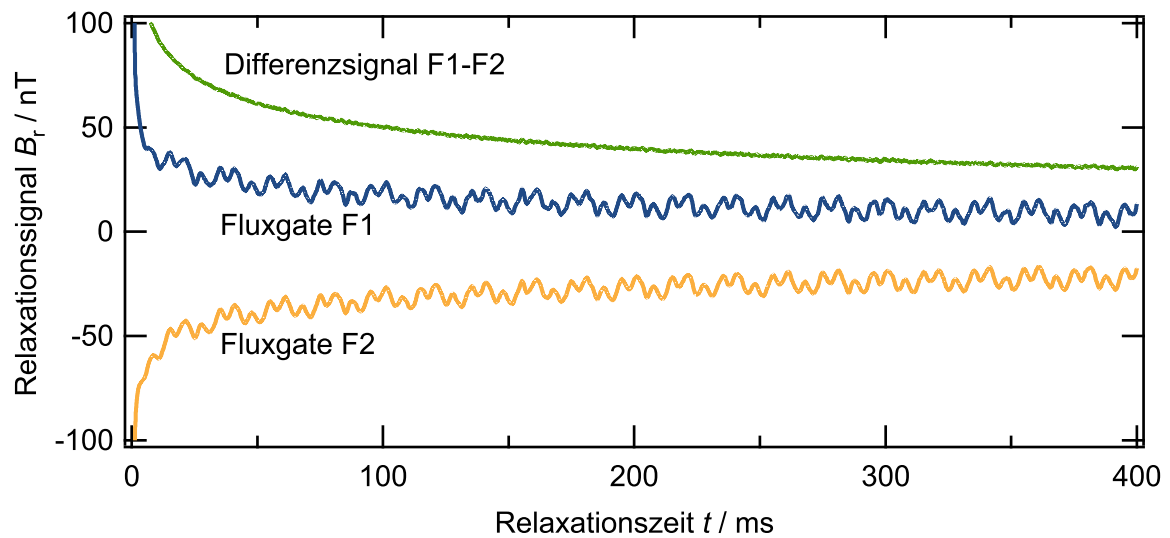


Abb. 2.6 – Veranschaulichung der Störfeldunterdrückung der differentiellen Fluxgate-Anordnung anhand einer Relaxationsmessung in unabgeschirmter Umgebung.

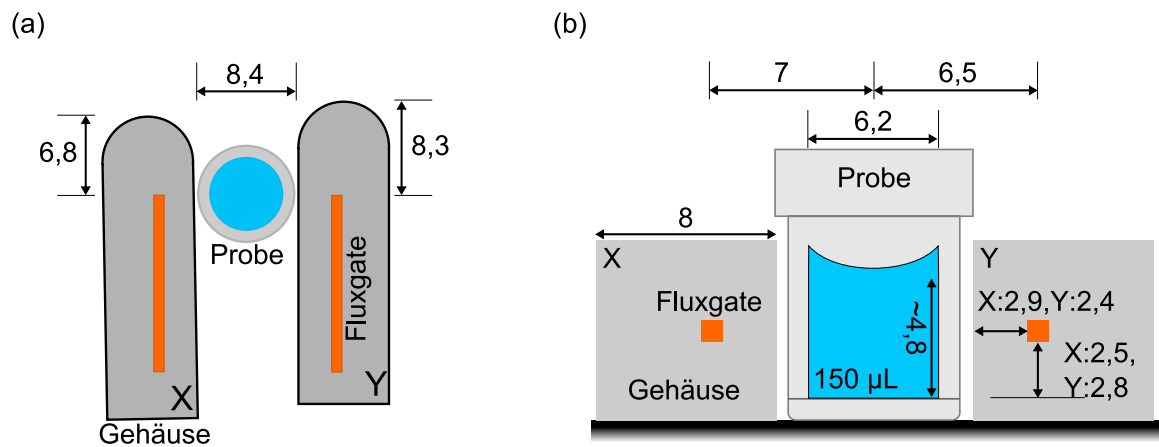


Abb. 2.7 – Geometrische Anordnung der Fluxgate-Magnetometer zur Probe. (a) Draufsicht. (b) Vorderansicht.

mit einem kleinen magnetischen Dipol das Sensorgehäuse abgerastert und die Stellen maximaler Detektion am Gehäuse ermittelt. Diese können über die Längsverschiebungen separat eingestellt werden. Die resultierenden Abmessungen sind in den Abbildungen 2.7(a) und 2.7(b) in einer Draufsicht und Vorderansicht gezeigt. Der Abstand der Sensoren zur Probe sollte so gering wie möglich sein, damit sie sich in einem Bereich befinden, in dem das Streufeld der Probe groß ist.

Systemhardware

Zur Datenaufnahme wird ein Personal Computer (PC) verwendet. Dieser ist mit einer 4-Kanal 24 Bit Analog-Digital-Umsetzer-Karte PCI NI 4474 mit 102,4 kS/s und einer 8-Kanal 16 Bit Digital-Analog-Umsetzer-Karte PCI NI 6733 mit 1 MS/s von National Instruments bestückt. Über die Analog-Digital-Umsetzer-Karte werden die Signale der beiden Fluxgate-Magnetometer und der aktuelle Strom durch die Spule gemessen. Die Digital-Analog-Umsetzer-Karte dient dazu, den Soll-Wert des Spulenstroms über eine Spannung der Spulenelektronik bereitzustellen. Beide Karten lassen sich synchron betreiben und gewährleisten somit eine zeitpunktgenaue Subtraktion der beiden Signale der Fluxgate-Magnetometer und die Zuordnung zum eingestellten Magnetfeld.

Systemsoftware

Die Systemsoftware wurde in der Entwicklungsumgebung LabWindows der Firma National Instruments [100] entwickelt. Mit ihr ist es möglich, in einer C-Entwicklungsumgebung komfortabel auf Bibliotheken von National Instruments zur Ansteuerung der Datenerfassungskarten, Erstellung der Benutzeroberflächen und Datenverarbeitung zurückzugreifen. Eine textbasierte Entwicklung bietet den Vorteil einer Versionsverwaltung mit Standardsystemen wie des in dieser Arbeit eingesetzten Programms „subversion“ [101].

Es wurde auf eine modulare Entwicklung geachtet, die es ermöglicht, Datenaufnahmen und Benutzeroberfläche austauschbar zu gestalten. Benutzeroberflächen können nicht nur sprachlich sondern vor allem optisch an die Größe und Art eines Bildschirms angepasst werden. Auch ein Austausch der Datenerfassungskarten ist leicht möglich.

Über eine Konfigurationsdatei können Systemparameter wie Kalibrierungskonstanten, Messparameter, Art der Datenerfassungskarten oder Benutzeroberfläche gespeichert werden. Über die Benutzeroberfläche können die Messparameter intuitiv eingestellt werden.

In Abbildung 2.8 sind mögliche Messabläufe dargestellt. Die schwarze durchgezogene Linie stellt eine Standardmessung dar. Zuerst wird die Probe einige Millisekunden lang ohne externes Magnetfeld gemessen, um eine Information über die magnetische Vorgeschichte bzw. Remanenz der Probe zu erhalten. Um die Magnetisierungsdynamik zu beobachten, wird eine einstellbare lineare Rampe bis zum Magnetisierungsfeld H_{mag}

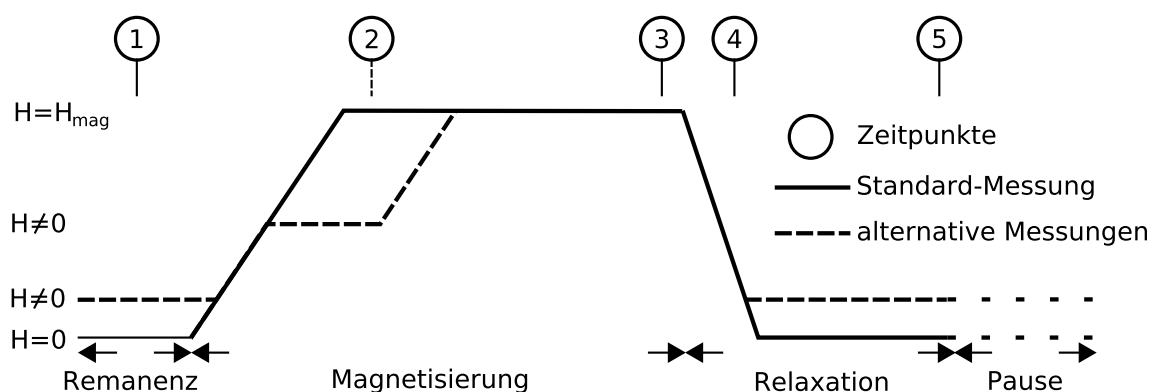


Abb. 2.8 – Messablauf einer MRX-Messung.

angelegt und das Magnetisierungsfeld wird für eine Zeit lang konstant gehalten. Nach einer vorgegebenen Zeit wird eine Rampe bis zum Feld $H = 0$ angelegt, um dann die Relaxation der Probe zu beobachten. Für weitere Messungen können zusätzliche Einstellungen vorgenommen werden. Dies wird mit der gestrichelten Linie gezeigt. Es können Offsetfelder eingestellt und eine weitere Stufe während der Anstiegsrampe definiert werden. Die Zeitpunkte 1 bis 5 markieren besondere Zeitpunkte während einer Messung. Die Stabilität des Messsystems (Drift) oder der Probe (Remanenz, Sedimentation) kann anhand dieser Zeitpunkte beobachtet und überprüft werden. Der Mittelwert über eine einstellbare Datenlänge wird zu den folgenden Zeitpunkten (Abbildung 2.8) gespeichert:

1. kurz vor dem Anschalten des Magnetfelds
2. kurz nach dem Anschalten des Magnetfelds
3. kurz vor dem Abschalten des Magnetfelds
4. kurz nach dem Abschalten des Magnetfelds
5. am Ende der Messzeit.

Die Messdaten werden mit einem automatisch generierten Dateinamen gespeichert, der neben dem Probenamen weitere wichtige Informationen wie Datum, Uhrzeit und die wichtigsten Messparameter enthält. In den Messdaten werden gemittelte Daten der beiden Fluxgates, des Differenzsignals und des Stromverlaufs abgelegt. Zusätzlich können auch die Messdaten der einzelnen Messungen gespeichert werden. Neben den Messdaten werden noch weitere Informationen gespeichert. Zentrale Bedeutung hat die Beschreibungsdatei (*Dateiname.hdr*). In ihr sind wichtige Informationen zur Messung enthalten. Es sind neben dem Messverlauf und Informationen zur Probe auch die Kalibrierkonstanten des Messsystems enthalten. Weiterhin gibt es noch eine Verlaufsdatei, die Messwerte an den oben beschriebenen Punkten enthält, und eine Statistikdatei, die zu diesen Zeitpunkten bestimmte Mittel-, Maximal-, Minimalwerte und Standardabweichungen beinhaltet. Bei der Auswertung der Messdaten ist es mit diesen Informationen möglich, die Stabilität der Messung nachzuvollziehen und die Plausibilität der Messung zu überprüfen.

Abbildung 2.9 zeigt ein Bildschirmfoto der im Laufe dieser Arbeit erstellten Benutzeroberfläche, wie sie mit einem herkömmlichen Monitor benutzt werden kann.

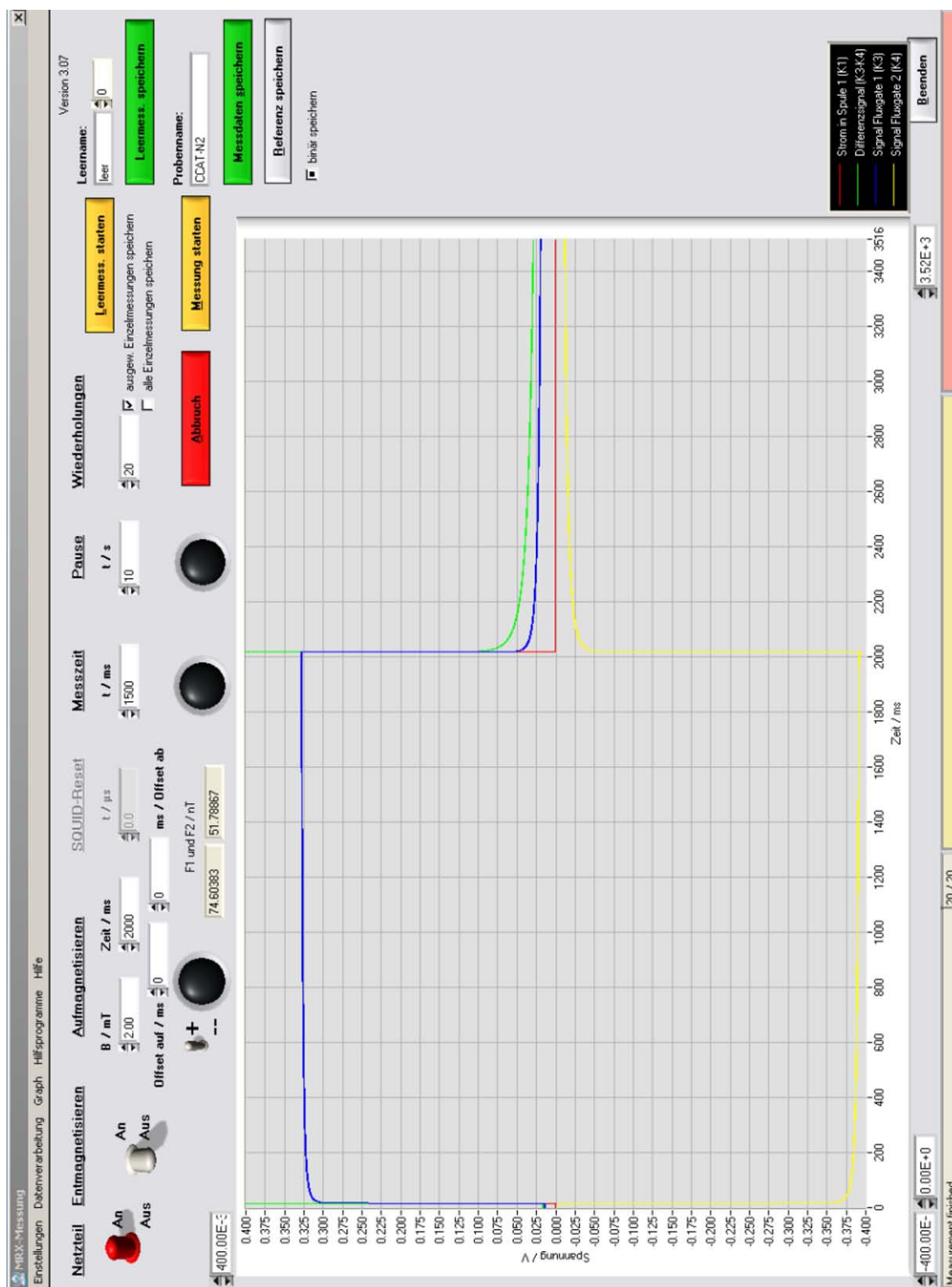


Abb. 2.9 – Bildschirmfoto der Systemsoftware für die Benutzung des MRX-Systems mit einem herkömmlichen Monitor.

2.2 MRX-Analyzer

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts „Messtechnik zur Qualitätssicherung magnetischer Nanopartikel für Anwendungen in Medizin und Bioanalytik“ wurde in dem Teilprojekt des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik „Entwicklung eines auf Fluxgates basierten Demonstrators zur Qualitätssicherung magnetischer Nanopartikel für Anwendungen in Medizin und Bioanalytik“ das vorher beschriebene MRX-Forschungssystem inklusive eines Personal Computers (PC) zur Datenaufnahme und -auswertung in ein 19"-Gehäuse integriert. Das Ziel ist es, ein Laborgerät für Hersteller und Anwender von magnetischen Nanopartikeln bereitzustellen, um diese zu charakterisieren und Anwendungen mit ihnen durchzuführen. Dies ist ein wichtiger Fortschritt, da existierende Messaufbauten in Forschungslaboren groß und kostenintensiv sind.

In Abbildung 2.10 ist der in dieser Arbeit entwickelte MRX-Analyzer zu sehen. Zur Durchführung und Auswertung der Messung ist ein berührungssensitiver 7"-TFT-Bildschirm integriert sowie Tasten und ein Drehknopf, mit denen die Messungen konfiguriert und durchgeführt werden können. Mittig ist eine Schublade angebracht, auf der sich die Messeinheit mit Spulen und zwei Fluxgate-Magnetometern zur Magnetrelaxationsmessung befindet. Abbildung 2.11 zeigt die Fluxgates, die im Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik (EMG) von Herrn Dipl.-Ing. R. Piel für den Einsatz im MRX-Analyzer hergestellt worden sind. Die elektromagnetische Störumgebung in dem MRX-Analyzer ist aufgrund des Personal Computers, der Festplatte, der Schaltungsteile und des magnetischen 19"-Metallgehäuses erheblich. Daher wurde die Messeinheit so klein wie möglich gestaltet und mit größtmöglichem Abstand zu den Störquellen im 19"-Gehäuse positioniert. In Abbildung 2.12 sind die Hardwarekomponenten des MRX-Analyzers aufgelistet, die im Folgenden näher beschrieben werden.

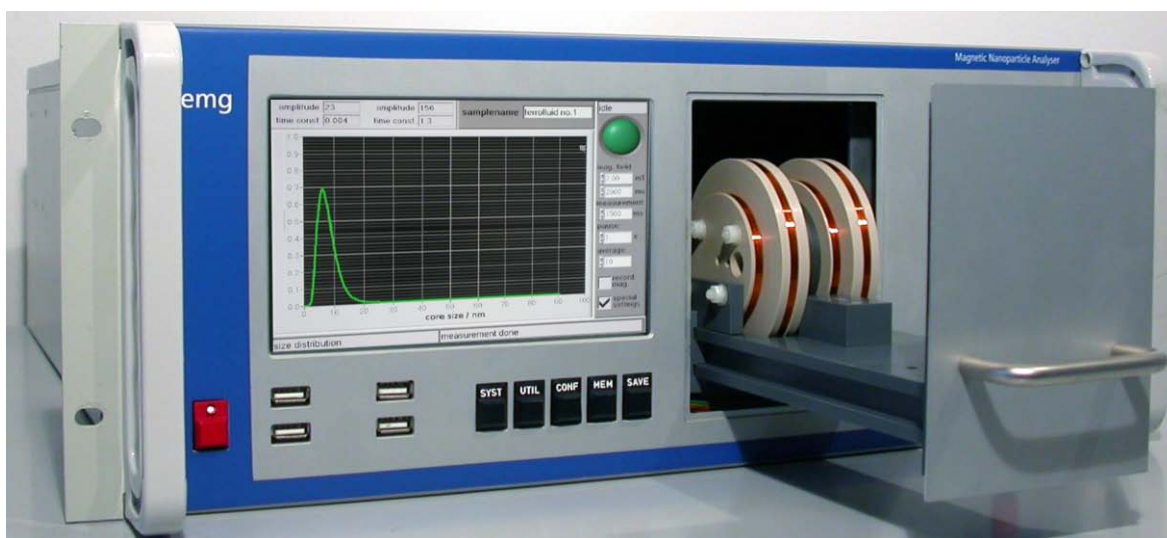


Abb. 2.10 – Fotografie des entwickelten MRX-Analyzers.

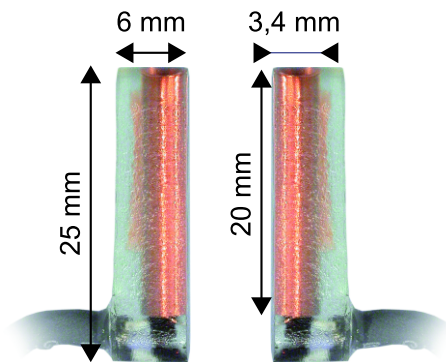


Abb. 2.11 – Fotografie der im MRX-Analyzer eingesetzten EMG-Fluxgates.

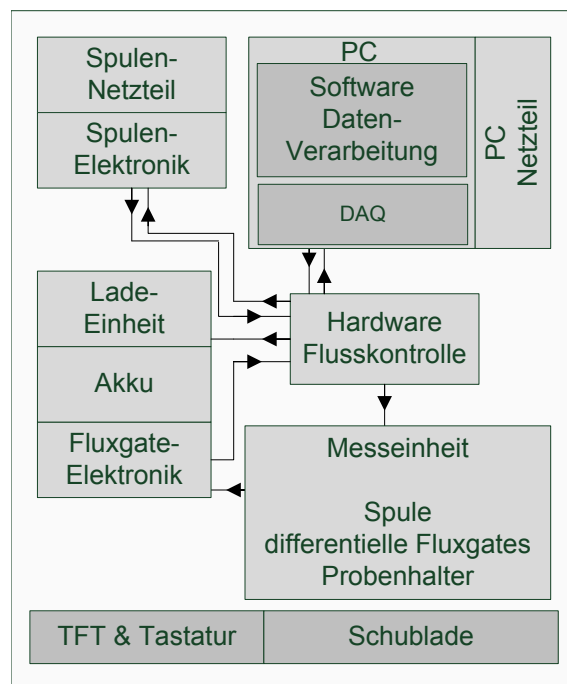


Abb. 2.12 – Blockschaltbild der Hardwarekomponenten des MRX-Analyzers.

2.2.1 Spule und Spulenelektronik

Spule

Im Gegensatz zum MRX-Forschungssystem mit einer orthogonalen 3-achsigen Helmholtz-Spule wurde in dem MRX-Analyzer zur Erzeugung eines homogenen Magnetfelds ein spezielles uniaxiales, kompensiertes Spulensystem eingebaut. Im Zentrum der Spule ist eine Probenaufnahme vorgesehen. Die Fluxgate-Magnetometer trennt von der Probenaufnahme eine ca. 0,5 mm dicke PVC-Wand. Die Spulenkonstruktion erzeugt im Vergleich zu einer Helmholtz-Spule einen größeren homogenen Innenbereich und ein kürzeres räumliches Abklingen des äußeren Felds [102]. Letzteres magnetisiert die umgebenden Metallteile weniger auf und verringert Wirbelströme in diesen. In Abbildung 2.13(a) und (b) ist die axiale z -Komponente des magnetischen Felds einer Helmholtz-Spule und der kompensierten Spule gezeigt [102]. Hier ist der größere homogene Bereich der kompensierten Spule zu erkennen. Die grauen Flächen repräsentieren Bereiche gleicher Homogenität ϵ (Zylinderkoordinaten (z, ρ, ϕ) mit der relativen Abweichung $\epsilon = \frac{H(z, \rho) - H(0, 0)}{H(0, 0)}$ von Innen nach Außen: $\epsilon < 10^{-6}$, $\epsilon < 10^{-5}$, $\epsilon < 10^{-4}$, $\epsilon < 10^{-3}$, $\epsilon < 10^{-2}$, $\epsilon < 10^{-1}$). In Abbildung 2.13(c) ist die berechnete und gemessene axiale Feldkomponente der für den MRX-Analyzer hergestellten kompensierten Spule halblogarithmisch dargestellt. Das Magnetfeld wurde auf der axialen Achse der Spule mit einer Hall-Sonde gemessen. Die Abstandsskala beginnt im Zentrum des Spulensystems. Es ist zu erkennen, dass ab ca. 6 cm der Verlauf des Spulenstreufelds deutlich schneller abfällt. Die kompensierte Spule wurde in der Abschirmkammer mit dem 3-achsigen-Helmholtz-System verglichen und es konnte Übereinstimmung im Relaxationsverlauf der Messdaten beobachtet werden. Bei

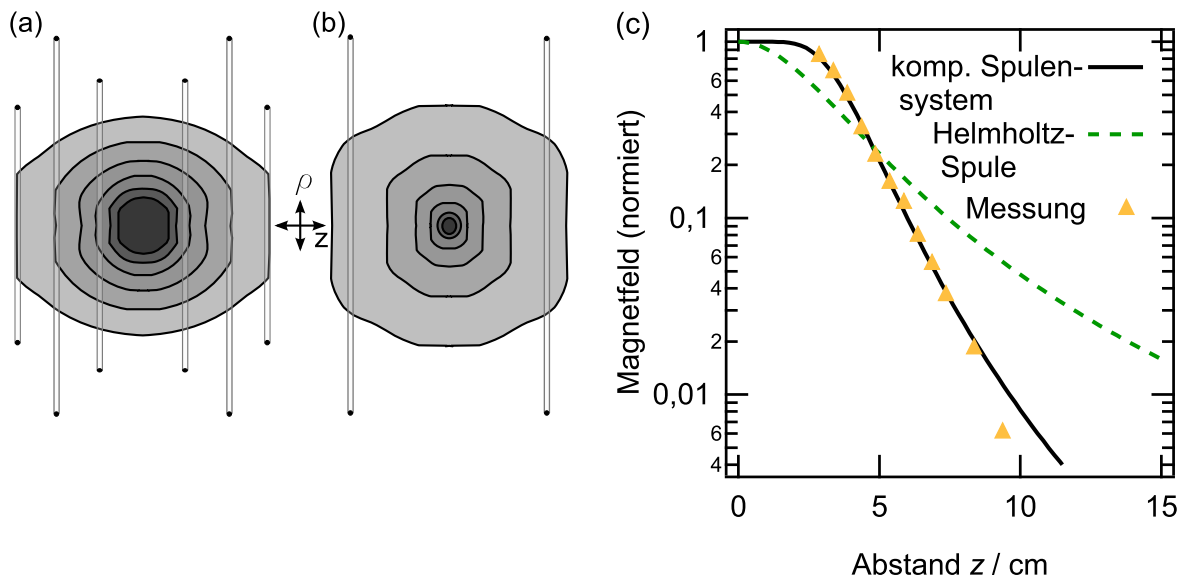


Abb. 2.13 – Simulation der magnetischen Feldhomogenität

(a) des kompensierten Spulensystems und

(b) einer Helmholtz-Spule (nach [102]).

(c) Vergleich des axialen Abfalls des magnetischen Felds einer Helmholtz-Spule und der kompensierten Spule.

Tab. 2.2 – Technische Daten der kompensierten Spule.

Beschreibung	Wert
maximaler Radius in mm	40
Gesamtbreite in mm	57
Anzahl Windungen pro Spule	65
Anzahl Lagen pro Spule	10
Spulenkonstante in mT/A	1,0
Induktivität in mH (gemessen)	$1,9867 \pm 0,0005$
Gleichstromwiderstand in Ω (gemessen)	$6,990 \pm 0,005$

gleicher optimaler Position der Fluxgate-Magnetometer ist die Empfindlichkeit, die im kompensierten Spulensystem erreicht wird, gleich der des 3-achsigen-Helmholtz-Systems. In Tabelle 2.2 sind die technischen Daten der kompensierten Spule aufgelistet.

Spulenelektronik

Die Spulenelektronik gleicht der des MRX-Forschungssystems. Die Standardflussdichte von 2 mT kann aufgrund der kleineren Spulen-Induktivität in 40 μ s abgeschaltet werden. Es sind magnetische Flussdichten bis zu 7 mT realisierbar.

2.2.2 Messwertaufnahme

Die Messeinheit wurde möglichst weit weg von allen aktiven und passiven Störquellen im 19"-Gehäuse positioniert. Hierdurch wird einerseits erreicht, dass die Aufmagnetisierungsspule umgebendes Metall möglichst wenig aufmagnetisiert und somit geringere Wirbelströme relaxieren können. Zum anderen können Störungen besser durch die Differenzbildung der beiden Fluxgate-Magnetometer eliminiert werden. Je weiter entfernt die Störquelle ist, desto homogener koppeln die Störsignale in die Magnetometer ein.

Messaufnehmer

Als Magnetfeldsensoren werden auch in diesem System Fluxgate-Magnetometer eingesetzt. In Abbildung 2.11 sind die für den Einsatz im MRX-Analyzer optimierten Fluxgate-Magnetometer gezeigt. Die Fluxgates haben einen Durchmesser von 3,4 mm und eine Länge von 20 mm. Sie sind in ein Gehäuse mit den Abmessungen 25 mm × 6 mm × 6 mm vergossen. Um den Abstand zur Probe möglichst gering zu halten, ist das Fluxgate dicht an einer Gehäusesseite positioniert. Das weiße Rauschen der Sensoren beträgt $10 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ bei einer Bandbreite von 10 kHz. Die höhere Bandbreite bietet den Vorteil, das Relaxationssignal zu einem früheren Zeitpunkt untersuchen zu können. Im Gegensatz zu den Bartington-Fluxgates haben diese Fluxgates geschlossene Racetrack-Kerne [83]. Hierdurch ist eine bessere Führung des magnetischen Flusses gewährleistet.

Systemhardware

Der MRX-Analyzer besteht aus einem handelsüblichen Personal Computer mit einer PCI-6221 Datenerfassungskarte (DAQ) der Firma National Instruments zur Datenaufnahme und Steuerung der Magnetfeldrampen. Weiterhin ist in ihm die Ausleseelektronik der Fluxgate-Magnetometer enthalten, die über eine Akkuversorgung betrieben wird. Eine Ablaufsteuerungskarte sorgt für ein Umschalten der Akkuladeeinrichtung auf den Messbetrieb und eine Weiterleitung der Sollwerte des Spulenstroms. Über einen berührungssensitiven 7"-TFT-Bildschirm sowie Tasten und einen Drehknopf auf der Vorderseite lässt sich der MRX-Analyzer bedienen. Die Anbindung an den PC wurde über einen USB-FX2-Chip der Firma Cypress als HID-Gerät realisiert [103].

Systemsoftware

Als Systemsoftware kommt das Programm aus dem MRX-Forschungssystem zum Einsatz. Dieses wurde um Module für eine weitere Datenerfassungskarte und eine zusätzliche Benutzeroberfläche für den kleineren, berührungssensitiven Bildschirm erweitert. Das Programm wird durch eine Konfigurationsdatei auf das jeweilige System eingestellt. In Abbildung 2.14 ist ein Bildschirmfoto der berührungssensitiven Benutzeroberfläche des MRX-Analyzer gezeigt. Der Bildschirm besitzt eine sichtbare Diagonale von 7". Die wichtigsten Messparameter sind auf dem Hauptfenster einstellbar. Weitere Parameter sind über Unterfenster zu erreichen. Der Bildschirm zeigt eine Relaxationskurve des gefriergetrockneten Ferrofluids fluidMAG 12/AS (Charge B) mit einer Feststoffkonzentration von 37 mg/mL. Die Datenaufnahme erfolgte hierbei noch mit Fluxgate-Magnetometern der Firma Bartington. Die Relaxationskurve ist vor der Darstellung auf dem Bildschirm mit

einem 3,5 kHz Tiefpass-Filter und einem 50 Hz Notch-Filter durch die Systemsoftware aufbereitet worden.

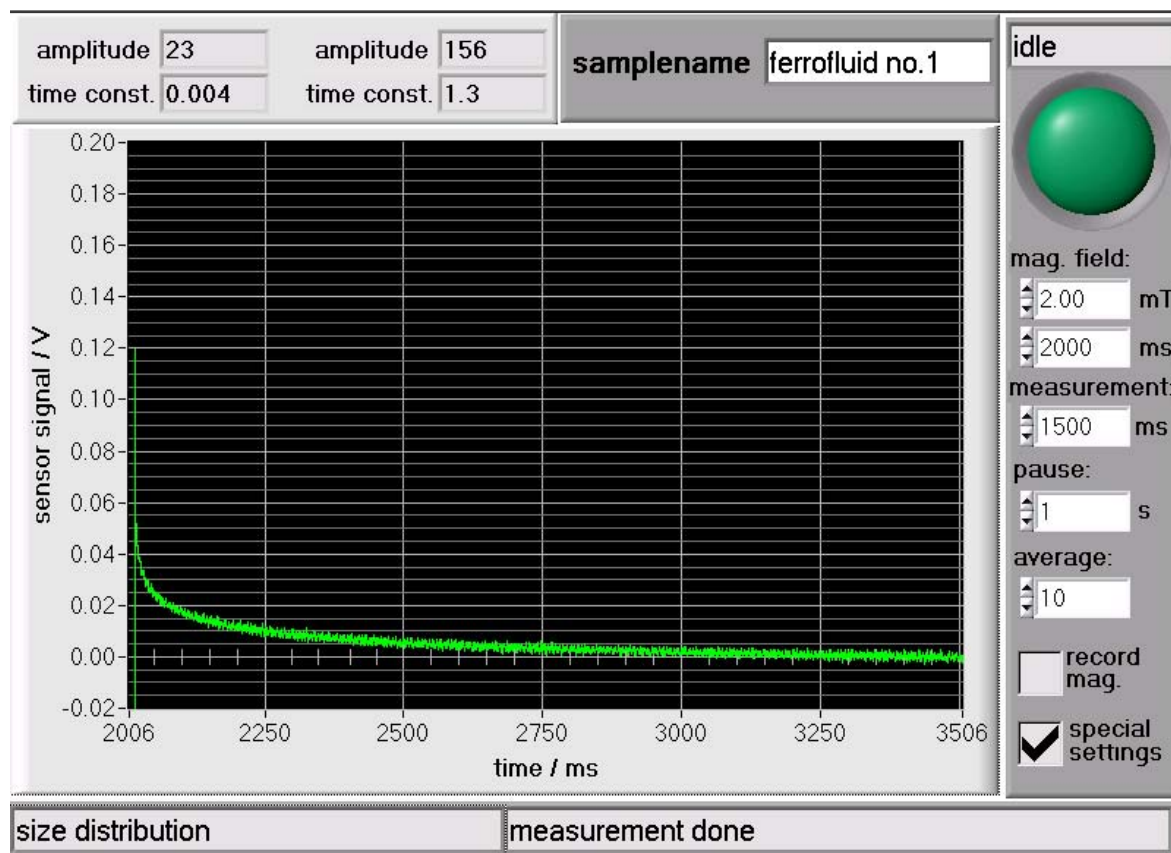


Abb. 2.14 – Bildschirmfoto der Benutzeroberfläche des berührungssensitiven TFT-Bildschirms.

2.3 Software zur Datenauswertung und Simulation

Zur Datenauswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein umfangreiches Programm auf Basis der Software IGOR Pro 6 der Firma Wavemetrics [104] erstellt. Die Bedienung des Programms erfolgt über eine grafische Benutzeroberfläche, die eine schnelle und übersichtliche Analyse der Messdaten erlaubt. Das Programm ist sowohl für die Charakterisierung der Messsysteme als auch für die Auswertung der MNP-Charakterisierung und von Bindungsexperimenten geeignet. Alle in dieser Arbeit ausgewerteten Relaxationsdaten wurden mit diesem Programm ausgewertet und grafisch dargestellt. Abbildung 2.15 zeigt eine Übersicht über die Möglichkeiten der Datenauswertung.

Datenauswahl

Zu Beginn wird eine Messung anhand ihrer Beschreibungsdatei (*Dateiname.hdr*) ausgewählt. In dieser Beschreibungsdatei sind alle messtechnisch relevanten Informationen zur Messung enthalten. Die Messdaten werden nach dem Laden mit den Systemkalibrierungskonstanten skaliert. Zusätzlich kann automatisch die passende Hintergrundmessung zur Relaxationsmessung geladen werden. Die Datenauswahl beschränkt sich nicht nur auf die resultierenden Relaxationsdaten. Es kann auf spezielle Datenreihen, wie die der einzelnen Fluxgate-Sensoren, den Stromverlauf oder Einzelmessungen aus einer Mitteilung, zugegriffen werden. Letzteres kann z.B. genutzt werden, um Kinetik-Experimente auszuwerten. Die detaillierten Auswahlmöglichkeiten bieten ein wichtiges Werkzeug für eine Systemcharakterisierung und eine Methodenvalidierung.

Datenaufbereitung

Im nächsten Schritt werden die Daten aufbereitet. Hierzu sind die folgenden verschiedenen Möglichkeiten vorhanden. Mit Hilfe einer Hintergrundmessung kann der Hintergrund von der Relaxationsmessung abgezogen werden. Auch eine Offsetkorrektur ist möglich. Um externe Störungen wie z.B. die Anregungsfrequenz der Fluxgate-Sensoren zu unterdrücken, können die Messdaten tiefpassgefiltert werden. Hierzu wird ein FIR-Filter mit Kaiser-Fenster benutzt. Die normierten Parameter sind in Tabelle 2.3 gezeigt. Um einen Phasenfehler beim Filtern auszuschließen, sind die Koeffizienten des FIR-Filters symmetrisch um $t = 0$ gewählt (Abbildung 2.16). Weiterhin ist eine Normierung der Messdaten auf einen beliebigen Zeitpunkt möglich. Um die Anzahl der Messpunkte für die Kurvenanpassung durch rechenintensive Algorithmen zu beschleunigen, können die Daten automatisch inklusive Filterung logarithmisch dezimiert werden. Diese Art der Dezimierung berücksichtigt die Gewichtung des Informationsgehaltes exponentieller Zerfallsprozesse. Nach jeder Datenaufbereitung ist es möglich, zum nächsten Schritt der Datenauswertung zu wechseln.

Datenauswertung und Simulation

Zur Datenauswertung stehen die Kurvenanpassungen mit einfachen Exponentialfunktionen und den Modellfunktionen aus Kapitel 1.3 zur Verfügung. Über eine visuelle Kontrolle können die Startwerte der Modellfunktionen für die Messdaten gewählt werden. Die erhaltenen Fitparameter werden in Tabellen verwaltet und können grafisch

dargestellt werden. Die physikalischen Modelle des MSM (1.37) und Cluster-MSM (1.38) können über die Zeitdauer des Magnetisierens und Relaxierens simuliert werden. Mit diesen Modellen ist es zusätzlich möglich, eine Kurvenanpassung an die Messdaten durchzuführen. Weiterhin können die Messdaten statistisch ausgewertet werden, um z.B. Standardabweichungen und Drifts zu jedem Zeitpunkt der Messung zu bestimmen. Die vielfältigen Möglichkeiten des Programms können benutzt werden, um die Messdaten zu analysieren und auszuwerten.

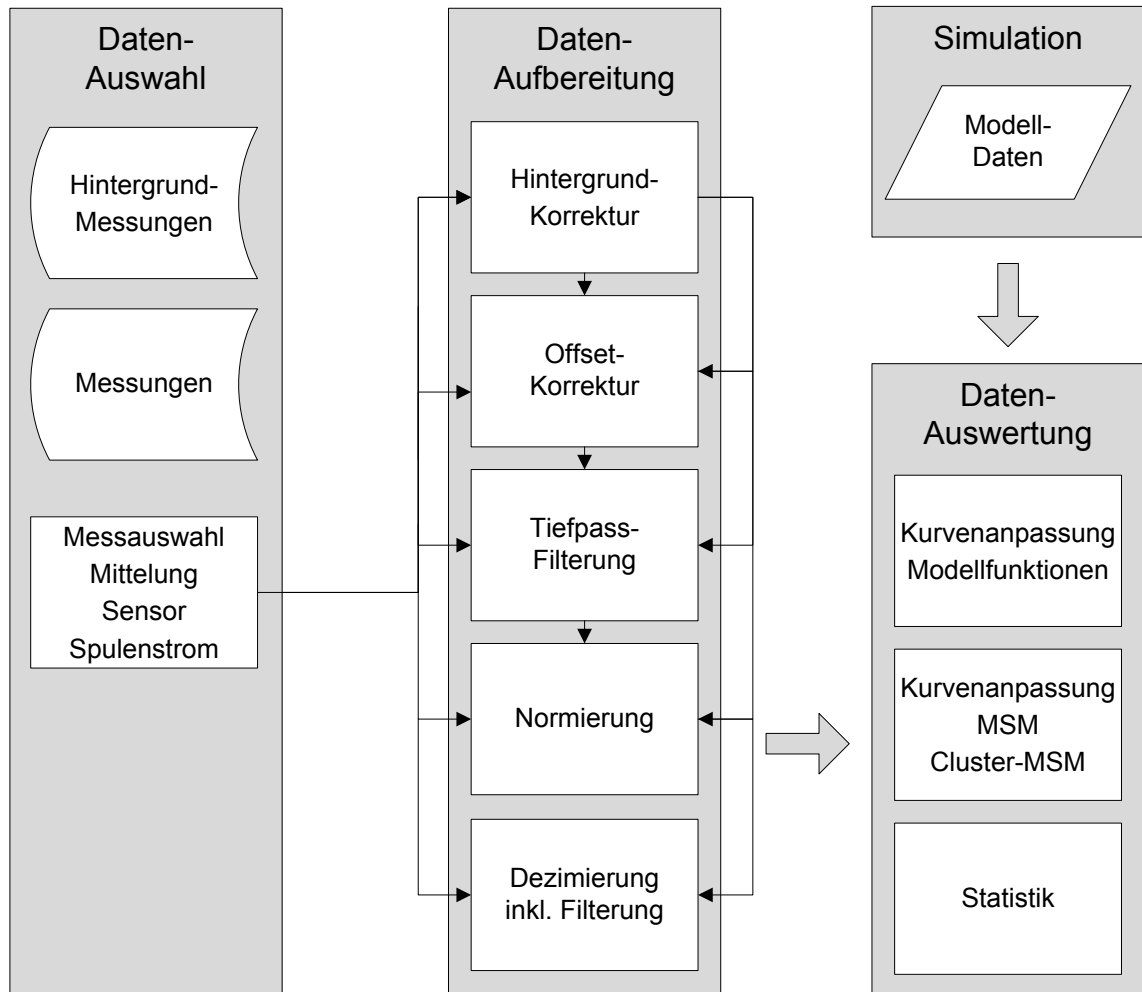


Abb. 2.15 – Übersicht der umfangreichen Möglichkeiten zur Datenauswertung.

Tab. 2.3 – Normierte Parameter des FIR-Tiefpassfilters mit Kaiser-Fenster (normiert auf 1 Hz Abtastrate).

Band	Start-Freq. in Hz/Hz	End-Freq. in Hz/Hz
Durchlassband	0	0,05
Sperrband	0,13 (-80 dB)	0,5

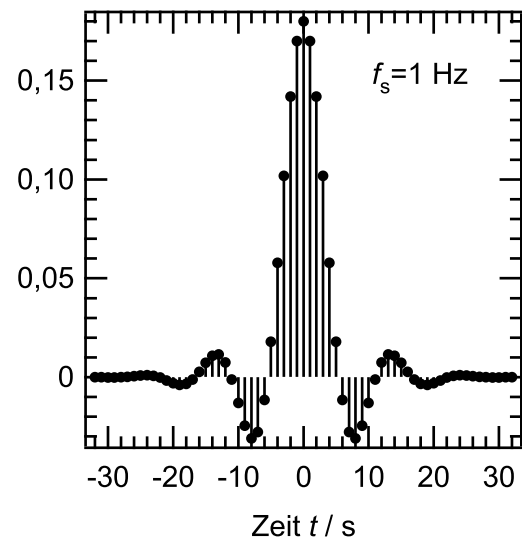


Abb. 2.16 – 63 Koeffizienten des FIR-Tiefpassfilters mit Kaiser-Fenster (symmetrisch um $t = 0$).

3 Charakterisierung des MRX-Forschungssystems

Um Entscheidungen aufgrund eines Analyseergebnisses treffen zu können, ist die Information über die Messunsicherheit eines Analyseverfahrens von grundlegender Bedeutung. In einer Methodenvalidierung wird nachgewiesen, dass ein Analyseverfahren den Anforderungen für den speziellen beabsichtigten Gebrauch genügt. Eine Methode umfasst dabei den gesamten Analysevorgang inklusive der Unsicherheitseinflüsse der Probe, des Messverfahrens und der Auswertung der Messdaten.

Mit den in dieser Arbeit aufgebauten Messsystemen können zahlreiche verschiedene Anwendungen durchgeführt werden. Die Art der Anwendungsdurchführung und die unterschiedlichen Marker und Analyten erfordern jeweils eine eigene Methodenvalidierung. In diesem Kapitel werden die grundlegenden Messunsicherheiten des aufgebauten MRX-Forschungssystems betrachtet, die dann in eine spezielle Methodenvalidierung einfließen. Zuerst wird die Eignung der Magnetrelaxationsmessung mit Fluxgate-Sensoren über Vergleiche mit dem SQUID-MRX-System der PTB Berlin und mit systematischen Messungen verifiziert. Mit den Kenntnissen aus den vorherigen Kapiteln 1 „Grundlagen“ und 2 „Entwicklung der Messsysteme“ wird dann die Messunsicherheit des MRX-Forschungssystems bestimmt. Die Gesamtmessunsicherheit des Systems wird dabei ohne und mit speziellen homogen präparierten Referenzproben angegeben.

Die Messunsicherheitsermittlung orientiert sich bei analytisch-rechnerischer Vorgehensweise („bottom-up“) an dem „Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen“ (GUM, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements) [7, 105]. Für analytische Messverfahren sind auf Basis der GUM weitere Leitfäden erschienen. Der EURACHEM/CITAC Leitfaden zur „Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen“ [106] zeigt, wie die Paradigmen der GUM auf chemische Analysen angewendet werden können. Anstelle eines vollständigen mathematischen Modells des Messsystems sind Teilmodelle betrachtet worden, die die relevanten Unsicherheitsbeiträge beschreiben und identifizieren. Die Gesamtunsicherheit des Messsystems wurde empirisch mit Wiederholmessungen bestimmt, die alle relevanten Unsicherheitsquellen des Messsystems einschließen. Solche „top-down“-Verfahren können mit dem GUM vereinbar durchgeführt werden [107, 108]. Der EURACHEM/CITAC Leitfaden „Measurement uncertainty arising from sampling“ [109] und der darauf basierende Nordtest-Leitfaden „Uncertainty from sampling“ [110] beschäftigen sich genauer mit den Unsicherheitsinflüssen der Probe. Für das Fluxgate-MRX-Verfahren relevante Einflüsse werden untersucht. Im letzten Abschnitt werden Versuche zur Messunsicherheit durchgeführt, die im Hinblick auf eine Methodenvalidierung eines Bindungsnachweises relevant sind.

3.1 Verifizierung des MRX-Forschungssystems

3.1.1 Vergleich mit dem PTB-SQUID-System

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das MRX-Forschungssystem mit einem Fluxgate-Sensor in der 3-achsigen-Helmholtz-Spule betrieben. Um zu untersuchen, inwieweit es möglich ist, mit diesem System Relaxationskurven aufzunehmen, wurden Vergleichsmessungen mit dem an der PTB Berlin entwickelten und etablierten SQUID-MRX-System [73] durchgeführt [92]. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe eines flüssigen Ferrofluids mit beiden Systemen vermessen.

Abbildung 3.1 zeigt die Parameter der Kurvenanpassung mit der phänomenologischen gestreckten Exponentialfunktion (1.43). In beiden Systemen ist die Amplitude $B_{B,0}$ linear abhängig von dem Eisengehalt der Probe. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für quantitative Messungen, da sie die Auswertung vereinfacht. Die Zeitkonstante τ_B und der Parameter β , der ein Maß für die Breite der Größenverteilung darstellt, ist von der Konzentration unabhängig und ihre Werte sind vergleichbar mit dem SQUID-MRX-System. Die Ergebnisse sind normiert dargestellt, da die Amplitude $B_{B,0}$ durch den unterschiedlichen Abstand vom Sensor zur Probe beider Systeme verschieden ist.

In Abbildung 3.2 ist der zeitliche Verlauf von zwei Relaxationskurven derselben Probe immobilisierten Ferrofluids fluidMAG-12/AS aufgetragen. Die Probe wurde mit dem aktuellen differentiellen MRX-Forschungssystem und dem SQUID-MRX-System gemessen. Die Relaxationskurven wurden mit einer Kurvenanpassung übereinandergelegt, bei der die eine Kurve mit einem Skalierungs- und einem Offset-Parameter an die andere angepasst wird. Die Offsetkorrektur ist notwendig, da die Relaxationskurven vom SQUID-MRX-System keine Information über das absolute magnetische Feld enthielten. Die Anpassung mit einem multiplikativen Faktor ist durch die unterschiedlichen Ab-

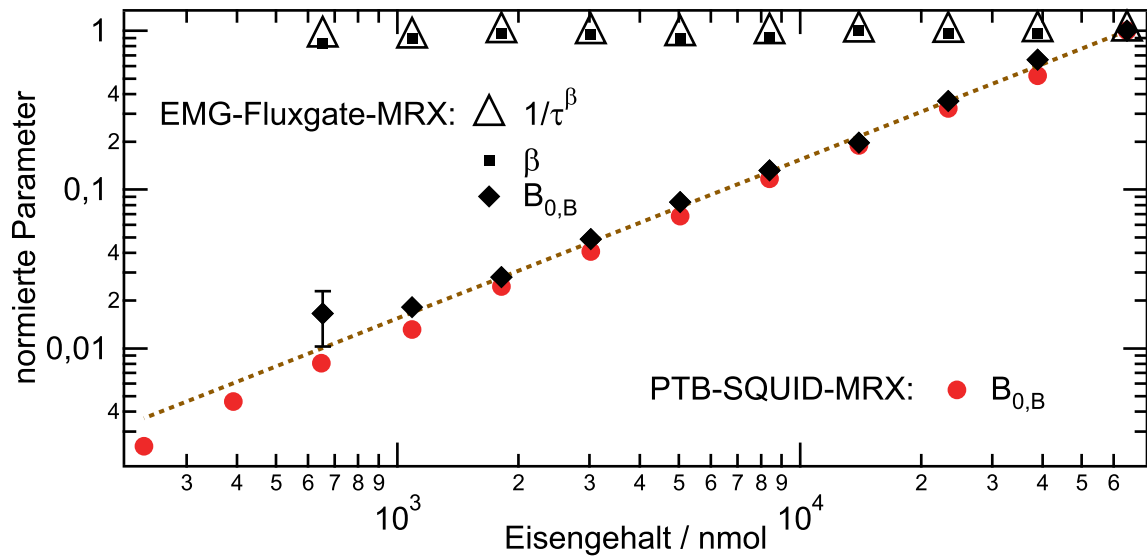


Abb. 3.1 – Vergleichsmessungen einer Verdünnungsreihe mit dem Fluxgate-MRX-Forschungssystem und dem SQUID-MRX-System der PTB Berlin.

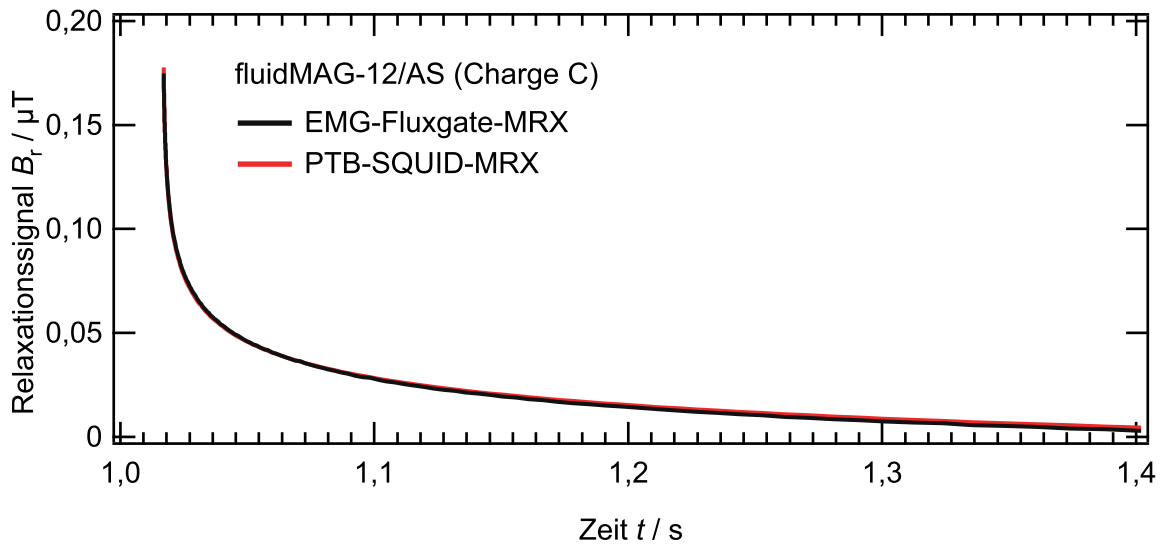


Abb. 3.2 – Vergleichsmessungen einer immobilisierten Probe mit dem Fluxgate-MRX-Forschungssystem und dem SQUID-MRX-System der PTB Berlin.

stände der Magnetfeldsensoren zur Probe begründet. Bei der Kurvenanpassung liegt das relative Abstandsmaß χ^2 in der gleichen Größenordnung wie bei Kurvenanpassungen mit den Modellfunktionen. Die Messungen zeigen, dass sich das differentielle MRX-Forschungssystem für Relaxationsmessungen magnetischer Nanopartikel eignet und vergleichbare Ergebnisse zum SQUID-MRX-System liefert. Alle folgenden Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit diesem differentiellen MRX-Forschungssystem durchgeführt.

Ein umfangreicher Vergleich mit dem im Jahr 2008 wesentlich weiter entwickelten differentiellen Fluxgate-System wird im BMBF-Projekt „QuaNTAMed“ durchgeführt. In diesem Projekt werden in Ringversuchen Relaxationszeiten, Nachweisgrenzen und Linearität anhand von unterschiedlichen Nanopartikeln verglichen.

3.1.2 Einfluss der Position der Fluxgate-Sensoren auf die Messergebnisse

Die Magnetisierung der Probe wird über ihr Streufeld mit Magnetfeldsensoren gemessen. Im differentiellen MRX-Forschungssystem detektieren zwei Fluxgate-Sensoren das Streufeld der Probe. Wie in Kapitel 1.6.4 beschrieben, kompensieren die Sensoren das gemessene Feld über Kompensationsspulen in ihrem Kern zu Null. Dies führt zu einer verbesserten Dynamik und Linearität. Da die Fluxgate-Sensoren sehr dicht an der Probe positioniert sind, könnte das Streufeld der Kompensationsspule die Probe beeinflussen. Das Messsystem würde auf die Probe zurückwirken. Um eine Vorstellung über die Größe dieses Streufelds zu bekommen, wurden mit dem Programm FEMM 4.0.1 [111] mit der Finite-Elemente-Methode (FEM) Berechnungen durchgeführt. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Berechnung für die Geometrie des MRX-Forschungssystems. Zu sehen ist die Feldverteilung der Kompensationsspulen, die auf die kugelförmige Probe zurückwirkt. Die Magnetisierung der Kerne wurde zuvor aus dem Streufeld der magnetisierten kugelförmigen Probe bestimmt. Das Verhältnis zwischen Kompensati-

onsfeld und Probenfeld im Zentrum der Probe beträgt $\sim 1/25$ (4%). Bei typischen Relaxationsfeldern von 5 nT bis zu einigen 100 nT sollte dies keinen messbaren Einfluss auf die Relaxationszeitkonstanten haben. Die Néel-Zeitkonstante (1.27) wird durch das Kompensationsfeld, das im Verhältnis zum Anisotropiefeld H_K klein ist, nicht messbar verkürzt.

Dies wurde experimentell überprüft, indem der Abstand eines Fluxgate-Sensors zur Probe variiert worden ist. Hierzu wurde eine immobilisierte Probe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS verwendet, da die Relaxationszeit im Sekundenbereich eine genauere Beobachtung zulässt. Vor jeder Messung wurde eine Hintergrundmessung ohne Probe durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt schematisch die Verschiebung des einen Fluxgate-Sensors entlang seiner Längsachse in positiver und negativer Richtung vom ursprünglichen Einbau, bei dem das Streufeld der Probe maximal detektiert wird. Es wurde an 7 Positionen gemessen. Während dieser Versuche waren die Fluxgate-Sensoren nicht durch die Abdeckplatte fixiert, um das Verschieben des einen Fluxgate-Sensors zu ermöglichen.

Abbildung 3.5(a) zeigt die offsetkorrigierten Relaxationskurven des stationären und des verschobenen Fluxgate-Sensors. Die 7 gemessenen Relaxationskurven des stationären Fluxgates Y liegen deckungsgleich übereinander, während die Relaxationskurven des verschobenen Fluxgates X alle ein niedrigeres Signal aufweisen, als in der ursprünglichen optimalen Position des Fluxgates X. Hiermit ist gezeigt, dass das Fluxgate X vorher optimal zur Streufeldmessung der Probe positioniert war. Das insgesamt niedrigere Signal des Fluxgates X lässt sich durch den ungünstigeren Einbau in sein Gehäuse erklären. Um zu zeigen, dass die Relaxationszeit durch den Fluxgate-Sensor nicht beeinflusst wird, wurden die Relaxationskurven an die jeweils optimale Position (0 mm) der Fluxgate-Sensoren angepasst. Hierzu wurden die Datenpunkte der Relaxationskurven mit einem Skalierungs- und Offset-Parameter mit der Methode der kleinsten Quadrate an die

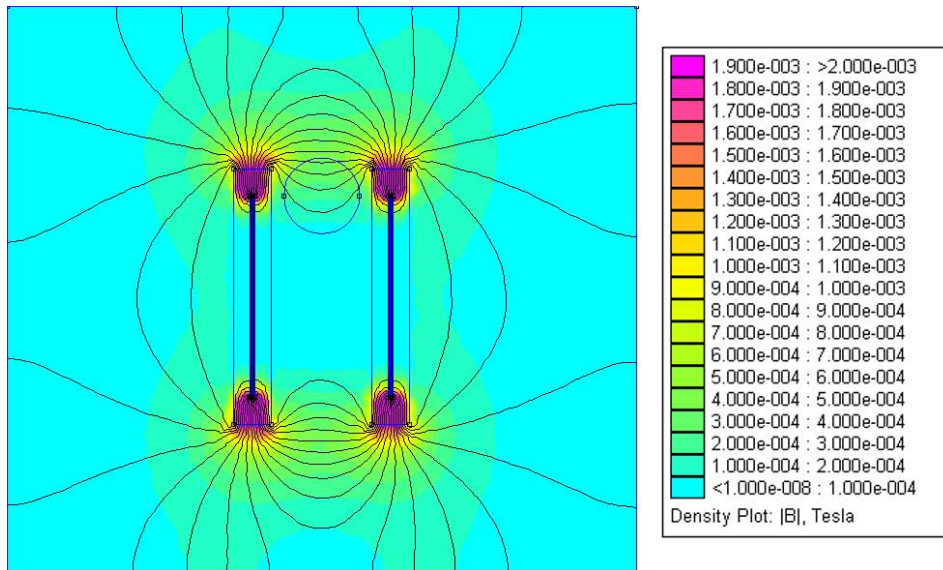


Abb. 3.3 – FEM-Simulation zur Rückkopplung der Fluxgate-Kompensationsspule auf die Probe.

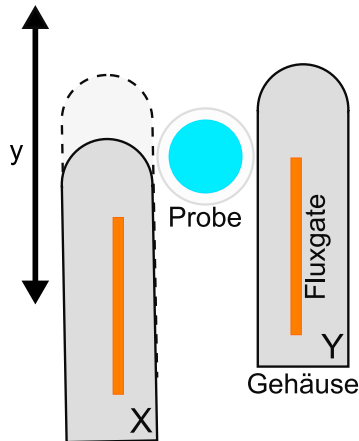


Abb. 3.4 – Skizze der Abstandsmessung.

Relaxationskurve der nicht verschobenen Position angepasst. Die Skalierungsfaktoren der Relaxationskurven sind in Abbildung 3.5(b) gezeigt und auf die nicht verschobene Messung normiert. Es ist eine leichte Veränderung des Skalierungsfaktors des stationären Fluxgates Y über die Messungen zu erkennen. Dies lässt sich durch eine kleine Änderung der Position durch die Verschiebung des anderen Fluxgates X erklären. Der Verlauf der Skalierungsfaktoren des verschobenen Fluxgate-Sensors zeigt, bezogen auf den ursprünglichen Einbau und wie an den Relaxationskurven zu erkennen, ein geringer werdendes Signal. Die um den Skalierungsfaktor korrigierten Relaxationskurven sind in Abbildung 3.5(a) durch die Kurve \diamond dargestellt. Sie liegen deckungsgleich übereinander. Für quantitative Aussagen wurden die gemessenen und skalierten Relaxationskurven mit der phänomenologischen logarithmischen Funktion (1.42) angepasst.

In Abbildung 3.5(c) und 3.5(d) sind die relativen Fehler für die Zeitkonstante τ_N sowie die Amplitude $B_{0,N}$ für die verschiedenen Abstände y aufgetragen. Die relativen Fehler der Zeitkonstante τ_N unterscheiden sich bei den gemessenen und skalierten Kurven nicht. Es ist jedoch eine Variabilität bei verschiedenen Abständen y zu erkennen. Da sich die Zeitkonstanten symmetrisch für beide Fluxgate-Sensoren ändern, ist zu vermuten, dass die Variabilität durch den Probenwechsel verursacht wurde. Die Amplituden $B_{0,N}$ der Kurvenanpassung stimmen nach der Skalierung der Messdaten sehr gut überein. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse mit ihren Standardabweichungen (Erweiterungsfaktor $k = 1$) quantitativ zusammen. Wie erwartet bleibt das Relaxationssignal des stationären Fluxgates Y konstant, während die Relaxationssignale des verschobenen Fluxgates X mit größerem Abstand vom Punkt maximaler Detektion geringer werden. Durch Skalierung der Relaxationssignale werden sie zur ursprünglich unverschobenen Position des Fluxgate-Sensors deckungsgleich. Die Verschiebung des Fluxgate-Sensors hat nur eine Skalierung des Signals zur Folge. Die Relaxationszeitkonstante bleibt im Rahmen der relativen Standardunsicherheit von $\pm 1,1 \%$ (Tabelle 3.1) unverändert.

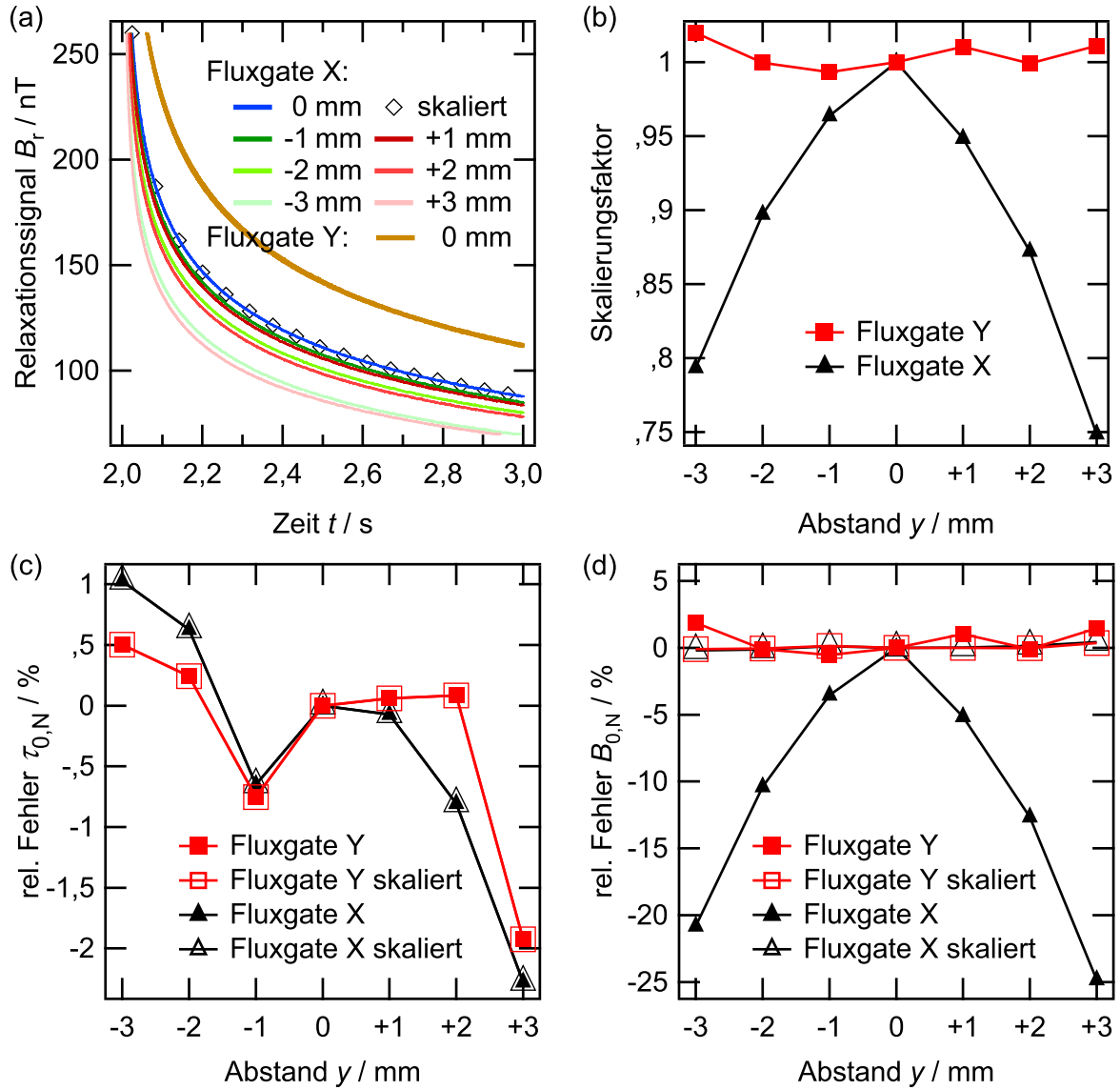


Abb. 3.5 – Einfluss des Abstands y des Fluxgates X auf die Messergebnisse:

- (a) Zeitlicher Verlauf der Relaxationssignal der Fluxgates X und Y,
 (b) relative Signalgröße in Abhängigkeit des Abstands y des Fluxgates X.

Relative Abweichung der Kurvenanpassungsparameter:

- (c) τ_N ,
 (d) $B_{0,N}$.

Tab. 3.1 – Parameter der Kurvenanpassung für die nicht verschobene Messung und Mittelwerte über die skalierten verschobenen Messungen. Erweiterungsfaktor $k = 1$.

Messung	$B_{0,N} / \text{nT } (V_k)$	$\tau_N / \text{ms } (V_k)$
Fluxgate X, 0	52,71	1,037
Fluxgate X, skaliert	$52,74 \pm 0,11$ (0,20 %)	$1,034 \pm 0,011$ (1,09 %)
Fluxgate Y, 0	67,20	1,048
Fluxgate Y, skaliert	$67,23 \pm 0,10$ (0,15 %)	$1,045 \pm 0,009$ (0,83 %)

3.2 Messunsicherheit des MRX-Forschungssystems

In diesem Abschnitt wird die Messunsicherheit des MRX-Forschungssystems ermittelt. Sie ist ein Teil der Methodenvalidierung eines Analyseverfahrens. Bei einer Methodenvalidierung wird das gesamte Verfahren betrachtet, das zu einem Analyseergebnis führt. Hierzu zählen Unsicherheiten der Probe, des Messverfahrens und der mathematischen Messdatenauswertung. Da der Einfluss der Probe je nach Anwendung sehr verschieden sein kann, wird das Messsystem zuerst ohne den Einfluss einer magnetischen Probe charakterisiert. Danach werden speziell präparierte Proben eingesetzt, mit denen grundlegende Einflüsse der Probe untersucht werden können. Die in diesem Kapitel ermittelten und quantifizierten Unsicherheitsquellen und die Erfahrungen aus dem Kapitel 5 „Anwendungen“ bilden die Grundlage für weitere Methodenvalidierungen, wie sie z.B. für einen Immunoassay auf Basis des MRX-Forschungssystems durchgeführt werden können.

3.2.1 Spezifikation der Messgröße

Der Aufbau des auf Fluxgate-Sensoren basierenden MRX-Messsystems wurde in Kapitel 2 „Entwicklung der Messsysteme“ beschrieben. Bei diesem Verfahren wird der zeitliche Verlauf des magnetischen Streufelds einer Probe mittels Magnetfeldsensoren gemessen. Die Messgröße ist eine zeitlich veränderliche magnetische Flussdichte $\vec{B}(\vec{r}, t)$, wobei \vec{r} der Abstand zwischen Sensor und Probe ist. Diese Messgröße kann mit mathematischen Algorithmen quantitativ ausgewertet werden. Daraus folgende Ergebnisse sind z.B. Anzahl gebundener Nanopartikel, Konzentration eines Analyten, Viskosität einer Flüssigkeit oder Kern- und Hüllen-Größenverteilung der magnetischen Nanopartikel eines Ferrofluids.

3.2.2 Aufstellen der Prozessgleichung

Die magnetische Flussdichte eines Nanopartikels \vec{B}_{MNP} am Ort \vec{r} kann durch einen magnetischen Dipol beschrieben werden:

$$\vec{B}_{\text{MNP}}(\vec{r}, t) = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{3(\vec{m}(t) \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{\vec{m}(t)}{r^3} \right). \quad (3.1)$$

Hier ist \vec{r} der Abstand zum magnetischen Moment $\vec{m}(t)$ des einzelnen Nanopartikels. Eine Integration über das Probenvolumen ergibt die gesamte magnetische Flussdichte B_{Probe} der Probe. Diese magnetische Flussdichte der Probe wird mit zwei Fluxgate-Sensoren gemessen. Durch die geometrische Anordnung der Helmholtz-Spule und der Probe zu den Fluxgate-Sensoren koppeln die magnetischen Felder unterschiedlich in die sensitive Achse der Fluxgate-Sensoren ein. Dies ist mit den folgenden Gleichungen für beide Fluxgate-Sensoren beschrieben, die die magnetischen Flussdichten der Helmholtz-Spule B_{mag} und der Probe B_{Probe} auf die sensitive Achse der Fluxgate-Sensoren projizieren:

$$B_{\text{Fluxgate1}} = k_{\text{F1},1} \cdot B_{\text{mag}} \cdot \sin(\Delta\Phi_{\text{F1},\text{mag}}) + k_{\text{F1},2} \cdot B_{\text{Probe}} \cdot \cos(\Delta\Theta_{\text{F1},\text{Probe}}), \quad (3.2)$$

$$B_{\text{Fluxgate2}} = k_{\text{F2},1} \cdot B_{\text{mag}} \cdot \sin(\Delta\Phi_{\text{F2},\text{mag}}) + k_{\text{F2},2} \cdot B_{\text{Probe}} \cdot \cos(\Delta\Theta_{\text{F2},\text{Probe}}). \quad (3.3)$$

Die Winkeldifferenzen $\Delta\Phi_{F,\text{mag}}$ und $\Delta\Theta_{F,\text{Probe}}$ beschreiben die Abweichung der senkrechten Ausrichtung der externen magnetischen Flussdichte B_{mag} und des magnetischen Dipolmomentes \vec{m} der Probe zu den sensitiven Achsen der Fluxgate-Sensoren. Sie sind durch den Zusammenbau des Messsystems festgelegt und können als nominell gleich betrachtet werden. Die Winkelunsicherheiten $\delta\Phi_{F,\text{mag}}$ und $\delta\Theta_{F,\text{Probe}}$ der beiden Winkeldifferenzen sind hauptsächlich durch die thermische Ausdehnung des Messaufbaus und den Probenwechsel verursacht und sind nominell gleich. Bei einer großen Probeninhomogenität kann das Dipolmoment der Probe sich aus dem externen Magnetfeld drehen und die Winkelunsicherheiten $\delta\Phi_{F,\text{mag}}$ und $\delta\Theta_{F,\text{Probe}}$ unterscheiden sich in diesem Fall. Der Faktor $k_{F,2}$ berücksichtigt Abweichungen der Homogenität der Helmholtz-Spule im Bereich der Fluxgate-Sensoren, und der Faktor $k_{F,1}$ berücksichtigt die Probengeometrie. Die magnetische Flussdichte $B_{\text{Differenz}}$, die proportional zum Streufeld der Probe ist, wird aus der Differenz der beiden Fluxgate-Signale berechnet:

$$B_{\text{Differenz}} = B_{\text{Fluxgate2}} - B_{\text{Fluxgate1}} . \quad (3.4)$$

Wie in Kapitel 2 beschrieben, verbessert dies das Signal-Rausch-Verhältnis bis zu einem Faktor von $\sqrt{2}$. Es werden zusätzlich externe homogene Störquellen unterdrückt. Mit Hilfe der Gleichungen (3.1) bis (3.4) werden die Unsicherheitsquellen identifiziert. Da die magnetische Flussdichte umgekehrt proportional mit der dritten Potenz des Abstands \vec{r} eingeht, wird die Probenhomogenität, Probenposition und mechanische Stabilität des Messsystem einen relevanten Einfluss haben. Da das Magnetisierungsfeld der Helmholtz-Spule senkrecht zur sensitiven Achse der Fluxgates liegt und damit über die Kosinusfunktion in Gleichung (3.2) und (3.3) detektiert wird, ist die mechanische Stabilität des Messsystems wichtig.

3.2.3 Identifizierung der Unsicherheitsquellen

Neben der Prozessgleichung sind Ursache-Wirkungs-Diagramme ein Hilfsmittel zur Identifizierung von Unsicherheitsquellen. In Abbildung 3.6 ist das Ursache-Wirkungs-

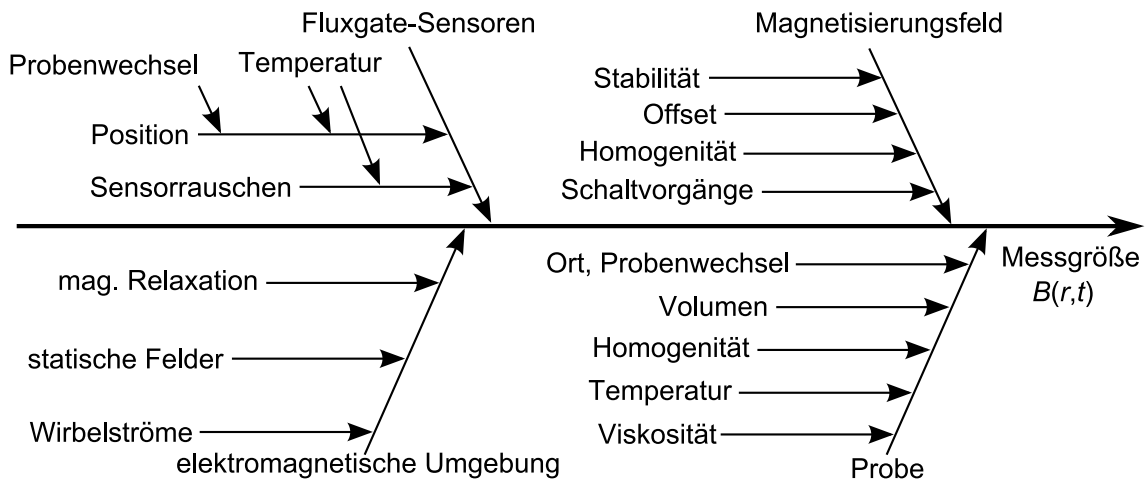


Abb. 3.6 – Ursache-Wirkungs-Diagramm der vom Fluxgate registrierten magnetischen Flussdichte $\vec{B}(\vec{r}, t)$.

Diagramm des vom Fluxgate-Sensor registrierten magnetischen Flusses gezeigt.

Die Haupteinflüsse stammen von den Fluxgate-Sensoren, dem Magnetisierungsfeld, der elektromagnetischen Umgebung und der Probe. Der Zweig der Probe soll, bis auf den Probenwechsel, bei der Betrachtung der Messunsicherheit des Messsystem nicht betrachtet werden. Da die Messunsicherheitseinflüsse des Messsystems unter realen Messbedingungen empirisch bestimmt werden, gehört ein Probenwechsel wegen der mechanischen Belastung des Messsystems zum Unsicherheitseinfluss des Messsystems. Das Magnetisierungsfeld, das die Probe aufmagnetisiert, muss über den Magnetisierungszeitraum stabil sein. Wird die absolute Größe des externen Magnetfelds H_{mag} in den mathematischen Modellgleichungen verwendet, muss dieser Wert bekannt sein. Dies ist z.B. bei der Charakterisierung von Nanopartikeln mit den magnetischen Momenten-Superpositions-Modellen (Kapitel 1.3.1) der Fall. Bei Auswertung der Signale mit den phänomenologischen Modellfunktionen (Kapitel 1.3.4) ist nur die Bedingung eines externen Magnetfelds mit gleichem reproduzierbaren Verlauf notwendig. Weiterhin soll die Relaxation der magnetischen Nanopartikel nach einem sprunghaftigen Abschalten des Magnetisierungsfelds erfolgen.

Alle diese Forderungen erfüllt die aufgebaute Spulenelektronik. Ein Operationsverstärker vergleicht über einen Shunt-Widerstand den Ist-Strom mit dem Soll-Strom und regelt die Spulen-Spannung je nach temperaturabhängigem Spulen-Widerstand nach. Die Homogenität des Magnetisierungsfelds im Bereich der Probe ist für die gleiche Ausrichtung aller magnetischen Nanopartikel wichtig. Die Einflüsse der elektromagnetischen Umgebung, wie Gleich- und Wechselfelder sowie durch Magnetisierungsvorgänge bedingte Wirbelströme und Relaxationen, werden von den Fluxgate-Sensoren registriert. Diese Einflüsse können durch den Versuchsaufbau und eine Hintergrundmessung korrigiert werden. Die Fluxgate-Sensoren tragen durch ihre Temperaturabhängigkeit, Position und ihr Sensorrauschen bei.

Unsicherheitsquellen der Probe

In dem Ursache-Wirkungs-Diagramm 3.7 sind die hauptsächlichen Unsicherheitsquellen der Probe aufgelistet. Die drei großen Gruppen bilden die Probenlagerung, Probenent-

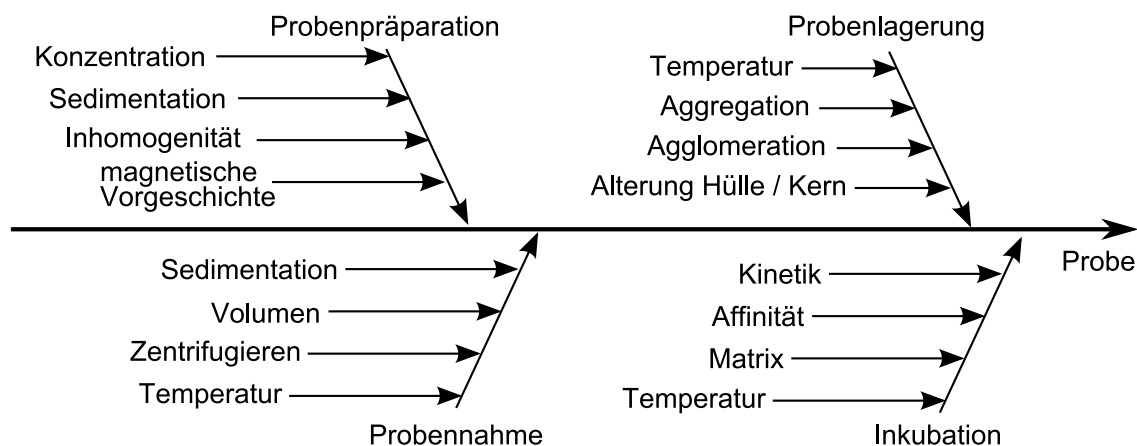


Abb. 3.7 – Ursache-Wirkungs-Diagramm der Probe.

nahme und Probenpräparation.

Während der Probenlagerung kann sich ein Ferrofluid verändern. Bei stabilen Ferrofluiden tritt der Alterungsprozess erst nach vielen Jahren auf. Befindet sich ein Ferrofluid jedoch in der Entwicklungsphase, so kann sowohl die Hülle als auch der magnetische Kern degradieren. Durch erhöhte Temperatur kann z.B. mikrobiologisches Fouling begünstigt werden. Je nach Stabilisierungsmechanismus und Alter der Hülle können Ferrofluide agglomerieren, was eine Sedimentation zur Folge haben kann.

Bei der Probenentnahme muss darauf geachtet werden, eine homogene Probe mit genauem Volumen zu erhalten. Bei der Entnahme des Ferrofluids treten Unsicherheiten zum einen durch die Volumenunsicherheit der Pipette (z.B. 0,6 % bei 100 μL destilliertem Wasser mit einer Eppendorf Multipette [112]) und je nach Konzentration und Art des Ferrofluids durch einen möglichen Verbleib von Ferrofluid in der Pipettenspitze auf.

Auch bei der weiteren Probenpräparation, z.B. beim Gefriertrocknen, ist darauf zu achten, Inhomogenitäten der Probe zu vermeiden. Die Probenlagerung und die Probenentnahme liegen in der Verantwortung des Experimentators und können von ihm gezielt beeinflusst werden oder können Gegenstand der Untersuchung sein.

Werden biochemische Nachweistests mit dem System durchgeführt, kommen noch weitere Unsicherheitsquellen hinzu, die unter dem Zweig Inkubation zusammengefasst sind. Die Bindung von Rezeptor und Ligand sollte bei einem Nachweistest reproduzierbar sein. In einer Matrix von verschiedenen Biomolekülen sollte der Ligand spezifisch und selektiv an den Rezeptor binden. Um ein reproduzierbares Messergebnis zu erhalten, muss die Bindungskinetik für einen sinnvollen Stoppzeitpunkt der Reaktion bekannt sein. Des Weiteren müssen die Inkubationsbedingungen reproduzierbar sein (z.B. gleiche Temperatur).

Unsicherheitsquellen der mathematischen Messdatenauswertung

In Abbildung 3.8 ist das Ursache-Wirkungs-Diagramm der quantitativen Auswertung des Relaxationssignals gezeigt. Die mathematische Auswertung hängt zum einen vom Signal-Rausch-Verhältnis und der Vollständigkeit der Messdaten ab. Aufgrund der begrenzten Bandbreite der Fluxgate-Sensoren von 3 kHz werden die Messdaten erst 400 μs nach

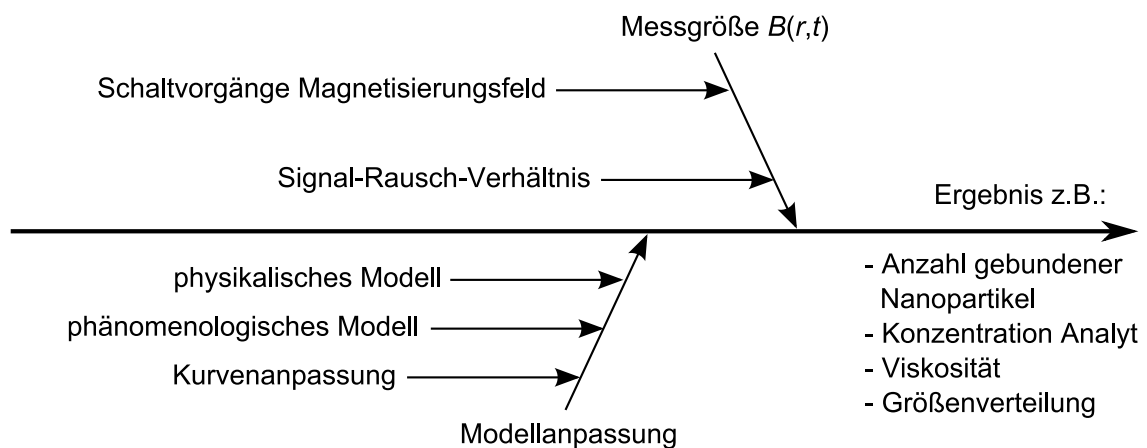


Abb. 3.8 – Ursache-Wirkungs-Diagramm der mathematischen Messauswertung.

Abschalten des Magnetfelds ausgewertet. Zum anderen werden mathematische Modelle angewendet, die idealisiert oder Näherungen sind. Eine genaue Untersuchung der mathematischen Messauswertung eines Bindungsnachweises mit der Superposition der Funktionen (1.43) und (1.42) wird im Abschnitt 3.4.2 durchgeführt.

3.2.4 Quantifizierung der Unsicherheitsquellen

Im „Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen“ DIN 13005 [7, 105] werden zwei Methoden zur Ermittlung der Standardunsicherheit festgelegt: Bei der Ermittlungsmethode vom Typ A wird die empirische Standardunsicherheit s aus mehreren Messwerten statistisch berechnet. Eine Standardunsicherheit s nach Typ B wird nicht aus mehreren Messwerten gewonnen, sondern durch eine wissenschaftliche Beurteilung, die z.B. Daten aus Kalibrierscheinen, Erfahrungen mit dem Messgerät oder Daten aus früheren Messungen nutzt. Zur Quantifizierung der Unsicherheitsquellen des Messsystems sind beide Ermittlungsmethoden angewendet worden. Die folgenden quantitativen Aufstellungen und Diskussionen der Unsicherheiten des Messsystems sollen die Einflüsse identifizieren, die maßgeblich zur Gesamtunsicherheit beitragen.

Korrigierbare systematische Abweichungen durch differentielle Messanordnung

Aufgrund der differentiellen Messung des Streufelds mit zwei Fluxgate-Sensoren können homogene elektromagnetische Störungen aus der Umgebung unterdrückt werden. Dies gilt z.B. für 50 Hz-Störsignale aus dem Stromnetz oder homogene magnetische Felder der Umgebung $\delta H_{\text{Umgebung}}$. Das pulsformige Magnetisierungsfeld des Messsystems magnetisiert die umgebenden Metallteile oder ruft Wirbelströme in ihnen hervor, die als magnetisches Feld $\delta H_{\text{Umgebung, mag}}$ während der Relaxationszeit zurückwirken. Der in die Fluxgate-Sensoren symmetrisch einkoppelnde Teil der Störsignale wird bei der Differenzbildung der Signale unterdrückt.

Korrigierbare systematische Abweichungen mittels Hintergrundmessung

Weitere systematische Messabweichungen können durch eine Hintergrundmessung bestimmt und korrigiert werden. Der asymmetrisch einkoppelnde Teil der Störsignale von magnetischen Metallteilen und Wirbelströmen ist im Differenzsignal der Hintergrundmessung und Probenmessung gleich und kann mittels der Hintergrundmessung korrigiert werden. Wird die magnetische Umgebung zwischen der Hintergrundmessung und Probenmessung durch unbeeinflussbare Vorkommnisse geändert, so liefert die magnetische Umgebung einen unbekannten systematischen Messunsicherheitseinfluss, der wie ein statistischer behandelt werden soll. Des Weiteren wird die einbaubedingte Verkipfung der Fluxgate-Sensoren gegenüber der Helmholtz-Spule durch die Hintergrundmessung korrigiert. Ein Probeneinbau kann zusätzlich kleinste Verkipfungen der Fluxgate-Sensoren verursachen. Dieser Einfluss wird als zufällig betrachtet und bei der Quantifizierung der Messunsicherheiten mit Wiederholmessungen bestimmt.

Korrigierbare systematische Abweichungen durch thermisches Gleichgewicht

Die Elektronik sowie der Messaufbau des Messsystems reagieren empfindlich auf Temperaturänderungen. Nach dem Anschalten des Systems sollte daher ca. 15 Minuten gewartet werden, um die Komponenten auf Betriebstemperatur zu bringen. Nach dieser Zeitspanne hat sich das System stabilisiert.

Quantifizierung der Messunsicherheit des Messsystems

Im Folgenden wird die Messunsicherheit quantifiziert, die bei Standardmessparametern für flüssige Proben gilt. Standardmessparameter für flüssige Proben sind:

- Hintergrundmessung vor der Probenmessung
- 2 Sekunden bei einer Magnetflussdichte von 2 mT magnetisieren und messen
- 1,5 Sekunden bei ausgeschaltetem Magnetfeld messen
- 2 Sekunden Pause
- 20 Wiederholmessungen

Die Messunsicherheitsbestimmung vom Typ A wurde experimentell durch Mehrfachmessungen mit speziellen homogen präparierten Referenzproben gewonnen. Drei Proben wurden jeweils 12-mal mit Standardmessparametern vermessen. Die Probe hat in diesem Abschnitt die Aufgabe, durch den Probenwechsel das Messsystem mechanisch zu belasten. Beim Wechsel der Probe kann sie die Fluxgate-Sensoren berühren und dabei kleine Lageänderungen der Fluxgate-Sensoren verursachen. Zur Quantifizierung der Messunsicherheit des Messsystems wurden die Hintergrundmessungen benutzt. Die Probenmessungen sind im nächsten Abschnitt zur Quantifizierung der Messunsicherheit mit Referenzproben ausgewertet worden. In Tabelle 3.2 sind die Messunsicherheitseinflüsse des Messsystems aufgelistet. Bei einer nach Typ A ermittelten Standardunsicherheit entspricht der Basiswert dem arithmetischen Mittelwert und die Unsicherheit der empirischen Standardunsicherheit s . Bei einer nach Typ B bestimmten Standardunsicherheit ist der Basiswert ein Schätzwert und die Unsicherheit ist die Standardunsicherheit vom Typ B.

Eine genaue Beschreibung der Bestimmung der einzelnen Einflüsse wird im Folgenden gegeben:

- Sensordaten, $\delta B_{\text{Offset},F1}$, $\delta B_{\text{Offset},F2}$, $\delta S_{\text{FluxgateX},F1}$, $\delta S_{\text{FluxgateY},F2}$

Die Sensordaten sind dem Kalibrierdatenblatt entnommen [98]. Die Anregungsfrequenz ist 15 kHz. Der Messbereich liegt zwischen $-100 \mu\text{T}$ und $+100 \mu\text{T}$ mit einer Unsicherheit des Offsets von $\pm 5 \text{ nT}$. Für das Fluxgate X beträgt das Flussdichterauschen $5,2 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ und für das Fluxgate Y $5,8 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ bei 1 Hz. Das während dieser Arbeit gemessene Flussdichterauschen bei 1 kHz beträgt für beide Fluxgates $3 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$.

- Einfluss der Spulentemperatur, $\delta T_{\text{Spulentemperatur}}$

Tab. 3.2 – Messunsicherheitsbudget des Messsystems.

Einflussgröße	Basiswert	Rauschen	Typ	Verteilung
Fluxgate-Sensoren				
$\delta S_{\text{Noise,FluxgateX(F1)}}$	1 Hz	5,2 pT/ $\sqrt{\text{Hz}}$	B	Normal
$\delta S_{\text{Noise,FluxgateY(F2)}}$	1 Hz	5,8 pT/ $\sqrt{\text{Hz}}$	B	Normal
$\delta S_{\text{Noise,FluxgateX(F1)}}$	1 kHz	3 pT/ $\sqrt{\text{Hz}}$	A	Normal
$\delta S_{\text{Noise,FluxgateY(F2)}}$	1 kHz	3 pT/ $\sqrt{\text{Hz}}$	A	Normal
Einflussgröße	Basiswert	Unsicherheit	Typ	Verteilung
Fluxgate-Sensoren				
$\delta B_{\text{Offset,F1}}$		$\pm 5 \text{ nT}$	B	Rechteck
$\delta B_{\text{Offset,F2}}$		$\pm 5 \text{ nT}$	B	Rechteck
Spulensystem				
δT_{Spule}	30 °C	$\pm 2 \text{ °C}$	B	Rechteck
$\delta H_{\text{mag,Offset}}$	2 mT	0,5 %	B	Rechteck
$\delta H_{\text{mag,Stabilität}}$	2 mT	5 ‰	A	Normal
$\delta H_{\text{mag,Homogenität}}$	2 mT	$\pm 70 \text{ nT in } 1 \text{ cm}^3$	B	Parabel
$\delta H_{\text{mag,Homogenität}}$	2 mT	$\pm 1,1 \text{ } \mu\text{T in } 2 \text{ cm}^3$	B	Parabel
Stabilität während der Magnetisierung				
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,mag}}$	0,29011 μT	$\pm 1,65 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,mag}}$	0,44878 μT	$\pm 2,98 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,mag}}$	0,73889 μT	$\pm 2,96 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta \Phi_{\text{F1,mag}}$	0,008313°	$\pm 0,000045^\circ$	A	Rechteck
$\delta \Phi_{\text{F2,mag}}$	0,012857°	$\pm 0,000085^\circ$	A	Rechteck
Stabilität während der Relaxation				
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,rel}}$	-0,56 nT	$\pm 0,11 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,rel}}$	-7,82 nT	$\pm 0,12 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,rel}}$	7,27 nT	$\pm 0,06 \text{ nT}$	A	Normal
$\delta \Theta_{\text{F1,rel}}$	$\delta \Phi_{\text{F1,mag}}$	$\pm 0,000045^\circ$	A	Rechteck
$\delta \Theta_{\text{F2,rel}}$	$\delta \Phi_{\text{F2,mag}}$	$\pm 0,000085^\circ$	A	Rechteck
korrigierbare Einflüsse				
$\delta H_{\text{Umgebung}}$	korrigierbar			
$\delta H_{\text{Umgebung,mag}}$	korrigierbar			

$\delta T_{\text{Spulentemperatur}}$ ist die Temperatur der Spule. Der Strom durch die Windungen der Spule hat eine Erwärmung auf ca. 30 °C zur Folge. Diese Temperatur wurde geschätzt. Der Versuchsaufbau wird erwärmt und es kann zu kleinen mechanischen Verschiebungen der Fluxgates kommen. Diese Verschiebungen wirken sich besonders während der Magnetisierung aus. Des Weiteren wird der elektrische Widerstand des Spulendrahts mit steigender Temperatur größer. Um ein konstantes Magnetfeld zu gewährleisten, regelt die Spulenelektronik den Strom über einen gekühlten Shunt-Widerstand unabhängig von der Spulentemperatur.

- Offset des Magnetisierungsfelds, $\delta H_{\text{mag,Offset}}$

$\delta H_{\text{mag,Offset}}$ ist eine Abschätzung der Unsicherheit des absoluten Magnetisierungsfelds. Das Feld wird auf der Grundlage der technischen Daten der Spule (Tabelle 2.1) über den Strom eingestellt.

- Stabilität des Magnetisierungsfelds, $\delta H_{\text{mag,Stabilität}}$

Die Drift des magnetischen Felds $\delta H_{\text{mag,Stabilität}}$ während der Magnetisierung wurde mittels 14 Standardmessungen untersucht. Zur Bestimmung der Messunsicherheit wurde während der Standardmessungen der Differenzstrom zu Beginn (100 ms – 200 ms) und kurz vor dem Abschalten des Magnetfelds (1,89 s – 1,99 s) über den Shunt-Widerstand ausgewertet. Vor jeder Standardmessung wurde die Probe gewechselt.

- Homogenität des Magnetisierungsfelds, $\delta H_{\text{mag,Homogenität}}$

Die Homogenität des Magnetfelds $\delta H_{\text{mag,Homogenität}}$ ist besonders wichtig im Bereich des Probenvolumens, damit alle magnetischen Nanopartikel mit der gleichen Feldstärke ausgerichtet werden und gleiche Anfangsbedingungen für die Relaxation haben. Berechnungen der Homogenität der 3-achsigen-Helmholtz-Spule ergeben für ein Volumen von 1 cm³ eine Inhomogenität von maximal 70 nT bei einer magnetischen Flussdichte von 2 mT.

- Verkippsänderung der Fluxgate-Sensoren während der Magnetisierung,

$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,mag}}, \delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,mag}}, \delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,mag}}, \delta \Phi_{\text{F1,mag}}, \delta \Phi_{\text{F2,mag}}$

Die Winkelunsicherheiten $\delta \Phi_{\text{F1,mag}}$ und $\delta \Phi_{\text{F2,mag}}$ beschreiben die Verkippsänderungen vom Fluxgate-Sensor zum Magnetisierungsfeld während des Magnetisierungsvorgangs. Durch die thermische Ausdehnung des Messaufbaus und bei einem Probenwechsel kann die einbaubedingte Verkipfung der Fluxgates sich ändern. Die Unsicherheiten der Sensorpositionen können über die Hintergrundmessung bestimmt werden und beinhalten dann die Unsicherheiten der Spulentemperatur $\delta T_{\text{Spulensystem}}$ und des Probenwechsels. Die Amplituden $B_{\text{Hintergrundmessung,F1,mag}}, B_{\text{Hintergrundmessung,F2,mag}}$ wurden aus den Hintergrundmessungen der Standardmessungen bestimmt und daraus die Standardunsicherheiten $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,mag}}, \delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,mag}}$ und $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Diff.,mag}}$ berechnet. Die Winkel $\delta \Phi_{\text{F1,mag}}, \delta \Phi_{\text{F2,mag}}$ wurden über die Beziehung

$$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F,mag}} = B_{\text{Hintergrundmessung,F,mag}} \cdot \sin(\delta \Phi_{\text{F,mag}}) \quad (3.5)$$

aus Gleichungen (3.2) und (3.3) berechnet.

- Verkippsänderung der Fluxgate-Sensoren während der Relaxation,

$$\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,rel}}, \delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,rel}},$$

$$\delta \Theta_{\text{Hintergrundmessung,F1,Probe}}, \delta \Theta_{\text{Hintergrundmessung,F2,Probe}}$$

Die Winkelunsicherheiten $\delta \Theta_{\text{F,Probe}}$ und $\delta \Phi_{\text{F,mag}}$ beschreiben die Verkippsänderung der Probe zum Fluxgate-Sensor während der Relaxation. Da die Relaxation kurz nach der Magnetisierung folgt, kann davon ausgegangen werden, dass die Winkel die gleichen Unsicherheiten zeigen wie die vorherigen Winkel. Während der Relaxationsmessung ist das statische Magnetfeld der Umgebung bedeutend. Dies wurde aus den Amplituden $B_{\text{Hintergrundmessung,F1,rel}}$, $B_{\text{Hintergrundmessung,F2,rel}}$ der Hintergrundmessungen bestimmt und daraus die Standardunsicherheiten $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F1,rel}}$, $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,F2,rel}}$ und $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,rel}}$ berechnet.

Quantifizierung der Messunsicherheit des Messsystems mit homogener Referenzprobe

Bis jetzt wurde ausschließlich die Messunsicherheit des Messsystems betrachtet. Eine Probenmessung bedingt viele weitere Unsicherheitseinflüsse, die bei der Identifikation der Messunsicherheitsquellen aufgeführt worden sind (Abbildung 3.7). Um einige von diesen auszuschließen, wurden spezielle Proben präpariert, die als homogene Referenzproben bezeichnet werden. Um eine Inhomogenität der Probe auszuschließen, wurden flüssige Proben gefertigt. Des Weiteren wurde das Probengefäß mit 210 μL Ferrofluid gefüllt. Dabei verbleibt nur eine kleine Luftblase im Probengefäß, die leicht in die Mitte der Wölbung des Probendeckels gebracht werden kann. Somit ist eine ungleichmäßige Verteilung des Ferrofluids innerhalb des Probengefäßes minimiert. Diese beiden Präparationsschritte ermöglichen bei einer Wiederholungsmessung eine nahezu unveränderte Probe. Es wurden drei Proben mit unterschiedlichem Eisengehalt von 63114 nmol, 7889 nmol und 986 nmol präpariert. Mit den drei Proben wurden die Wiederholpräzision und die Vergleichspräzision mit Messungen überprüft, die von einer anderen Person (B) und an einem anderen Tag durchgeführt worden sind. Die Proben wurden jeweils 12-mal unter Standardmessparametern für flüssige Proben gemessen. In Tabel-

Tab. 3.3 – Messunsicherheiten der homogenen Referenzproben. $N = 12$, $k = 1$.

Person	Eisen- gehalt in nmol	Magnetisierung 100 ms – 1,99 s B_{mag} in nT (V_k)	Relaxation (400 – 800) μs B_r in nT (V_k)	Relaxation (100 – 1490) ms B_r in nT
A	63 114	$13\,294,4 \pm 30,8(0,2 \%)$	$943,04 \pm 7,17(0,8 \%)$	$21,95 \pm 3,85$
B	63 114	$13\,447,2 \pm 56,0(0,4 \%)$	$986,41 \pm 15,31(1,6 \%)$	$26,82 \pm 4,60$
A	7 889	$1\,684,5 \pm 11,4(0,7 \%)$	$97,61 \pm 0,57(0,6 \%)$	$0,05 \pm 0,05$
A	986	$230,3 \pm 6,2(2,7 \%)$	$11,93 \pm 0,15(1,3 \%)$	$0,02 \pm 0,06$
A	Null	$913,4 \pm 1,8$	$10,79 \pm 0,08$	$12,01 \pm 0,08$

le 3.3 sind die Mittelwerte des Differenzsignals und die Standardabweichungen s in den angegebenen Zeitintervallen der Magnetisierung und der Relaxation gezeigt. Des Weiteren ist in den Zeitintervallen, die zur Konzentrationsbestimmung geeignet sind, der Variationskoeffizient V_k als Maß für die Präzision angegeben. Er ist definiert als Quotient aus empirischer Standardabweichung und arithmetischem Mittelwert. Die Präzision beschreibt die Streuung der Messwerte um den Mittelwert und ihre statistische Größe ist die Standardabweichung. An der Probe mit höchstem Eisengehalt wurde die Vergleichspräzision ermittelt. Bei den Proben mit weniger Eisengehalt war das Relaxationssignal im letzten Zeitintervall abgeklungen. Die Probenmessungen wurden im Gegensatz zu den Hintergrundmessungen jeweils mit der vorherigen Hintergrundmessung korrigiert. Daher sind die Signale der niedrigen Konzentration kleiner als die der Hintergrundmessung. Die höhere Standardabweichung der Probenmessungen im Vergleich zur Hintergrundmessung ist durch den Einbau und die Inhomogenität der Probe begründet. Die Unsicherheit der Probentemperatur δT_{Probe} kann bei dem MRX-Forschungssystem vernachlässigt werden, da es in einem klimatisierten Raum stationiert ist.

3.3 Untersuchung systematischer Messunsicherheitseinflüsse

3.3.1 Homogenität der Probe

Da die Detektion des Streufelds der Probe durch die Fluxgate-Sensoren vom Abstand abhängt, ist nicht nur die Position des Probengefäßes wichtig. Auch der Inhalt des Probengefäßes sollte homogen verteilt sein. Bei immobilisierten Proben kann z.B. durch den Gefriertrocknungsprozess eine inhomogene Verteilung der Nanopartikel innerhalb der Probe entstehen. Bei flüssigen Proben können Tropfen am Deckel des Probengefäßes verbleiben. Ein Zentrifugieren von flüssigen Proben ist nicht ratsam, da hierdurch größere Nanopartikel zum Gefäßboden transportiert werden.

Versuchsdurchführung

Um den Einfluss der Homogenität des Probenvolumens zu demonstrieren, wurde eine Probe präpariert, die 150 μL Ferrofluid enthält. Von diesem 150 μL Ferrofluid wurde ein Tropfen von 2 μL im oberen Bereich direkt unter den Deckel des Gefäßes pipettiert. Diese Probe wurde 5-mal, jeweils um 90° gedreht, im MRX-Forschungssystem gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 3.9(a) und (b) sieht man die Aufmagnetisierungs- und die Relaxationskurven für vier unterschiedliche Tropfenpositionen. Bei den Positionen 90° und 270° ist der Tropfen zugewandt zu einem Fluxgate. Bei 0° wurde nach dem Drehen eine zweite Messung durchgeführt, um die Wiederholpräzision zu überprüfen. Der Tropfen verursacht während der Aufmagnetisierung einen maximalen Signalunterschied von 40 nT bei einer mittleren Signalthöhe von 8,15 μT . Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 0,5 %. Bei den Relaxationskurven ist der Signalunterschied aufgrund der geringen

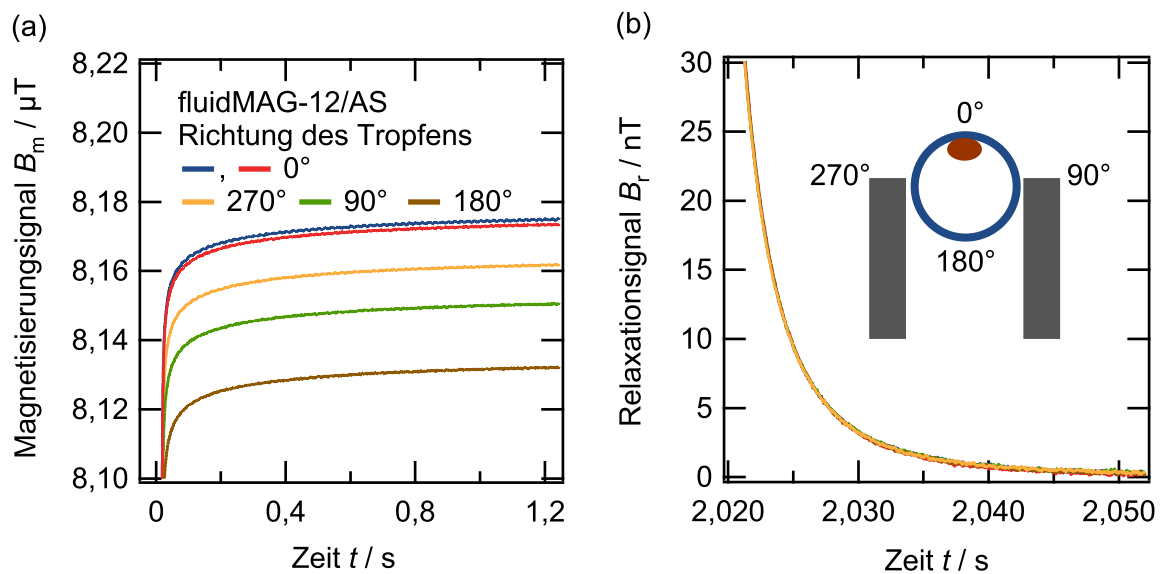


Abb. 3.9 – Homogenitätsmessung der (a) Magnetisierungskurven, (b) Relaxationskurven.

Signalhöhe nicht zu erkennen. Eine Inhomogenität beeinflusst das Messsignal während des Aufmagnetisierens stärker als während der Relaxation.

3.3.2 Sedimentation der Probe

Normalerweise unterliegen superparamagnetische Nanopartikel in einer Suspension keiner Sedimentation. Die thermische Energie ist größer als die Gravitationsenergie der Partikel. Werden jedoch biochemische Bindungsassays durchgeführt, binden die Nanopartikel an biologische Stoffe oder bilden Netzwerke mit dem Analyten aus. Hierdurch bilden sich größere Cluster, die aufgrund ihrer Größe sedimentieren.

Versuchsdurchführung

Um experimentell den Fehler bei einer Sedimentation zu bestimmen, wurden zwei flüssige Proben mit 40 μL Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) präpariert. Die erste Probe wurde als Vergleichsprobe zu einem Standardmessvolumen von 150 μL mit 110 μL voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) aufgefüllt, so dass das Probenvolumen im Probengefäß 5 mm hoch war und eine geringere Konzentration aufwies. Die zweite Probe, mit der die Sedimentation simuliert wurde, wurde nicht weiter aufgefüllt. Die 40 μL Ferrofluid ergeben ein 2 mm hohes Probenvolumen im Probengefäß. Abbildung 3.10(a) zeigt die Höhe der Messpositionen der Proben in Millimeter. Die Höhe der jeweiligen 40 μL -Probe ist relativ zur 150 μL -Vergleichsprobe jeweils darunter angegeben. Des Weiteren ist der Fluxgate-Kern eingezeichnet, der sich mittig zur 150 μL -Vergleichsprobe befindet.

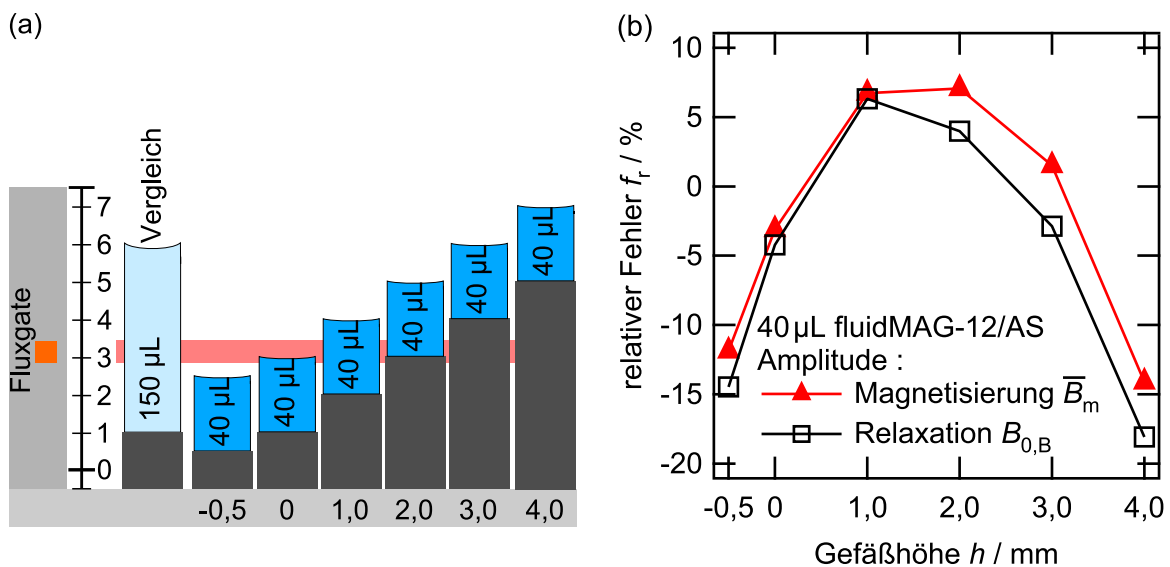


Abb. 3.10 – (a) Skizze der Sedimentationsmessung, (b) Relative Abweichung der Sedimentationsmessung in %.

Ergebnisse und Diskussion

Der Einfluss einer Sedimentation der Nanopartikel wurde mit Hilfe der unterschiedlichen Höhen der 40 μL -Probe während der Magnetisierungs- und der Relaxationsphase nachgestellt und untersucht. Während der Magnetisierung wurde die mittlere Signalamplitude $\overline{B_m}$ in einem Bereich von 500 ms kurz vor dem Abschalten des Magnetisierungsfelds betrachtet. Um den Einfluss auf die Relaxation zu beurteilen, wurden die Relaxationskurven mit der phänomenologischen gestreckten Exponentialfunktion (1.43) angepasst und der Parameter $B_{0,B}$ betrachtet. In Abbildung 3.10(b) sind die relativen Fehler der Parameter $\overline{B_m}$ und $B_{0,B}$ der 40 μL -Probenmessungen aufgetragen. Als richtiger Wert wurden die Parameter $\overline{B_m}$ und $B_{0,B}$ der 150 μL -Vergleichsprobe angenommen.

Das Signal der 40 μL -Probe entspricht dem Signal der 150 μL -Vergleichsprobe bei einer Gefäßhöhe zwischen 1 mm und 2 mm, wenn die Probe mittig zum Fluxgate-Kern positioniert ist. Je weiter entfernt das 40 μL -Probengefäß vom Fluxgate-Kern ist, desto geringer wird das Signal der Probe. Sedimentieren die magnetischen Nanopartikel von einem 150 μL -Volumen auf ein Volumen von 40 μL (Gefäßhöhe 0 mm), ist der relative Fehler ca. 5 %. Dies ist bei Messungen in flüssigen Medien zu beachten. Um die Sedimentation messtechnisch zu erfassen, könnten zwei zusätzliche Fluxgate-Sensoren ober- und unterhalb der Probe die Sedimentation messen. Bei weiterer Verwendung von zwei Fluxgate-Sensoren könnten diese auch ober- und unterhalb der Probe positioniert werden. Bei beiden Möglichkeiten ist die Probenzuführung problematisch, da der Probendeckel einen beliebigen Einbau der Probe verhindert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen Probenmischer in das Messsystem zu integrieren, der das Probengefäß vor jeder Messung schüttelt. Die letzte Möglichkeit funktioniert bei Proben, die nicht schneller als in 5 s sedimentieren.

3.3.3 Statisches Hintergrundfeld

In Abschnitt 1.2.2 wurde beschrieben, dass die Néelsche Zeitkonstante eines Ensembles von Nanopartikeln vom äußeren Magnetfeld abhängt. Allgemein wird ein Ensemble von magnetischen Nanopartikeln mit der Zeitkonstante relaxieren, die vom momentanen äußeren Magnetfeld abhängt. Ein Sonderfall stellt das Relaxieren ins magnetische Nullfeld dar. Die Néelsche Zeitkonstante vereinfacht sich zu Gleichung (1.25), die bei Messungen mit dem MRX-Forschungssystem innerhalb der Abschirmkammer angenommen wird. Dort beträgt das statische Restfeld 20 nT [113].

Versuchsdurchführung

Um die Magnetfeldabhängigkeit der Néelschen Zeitkonstante zu demonstrieren, wurde eine ungemittelte Relaxationskurve des immobilisierten Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge C) bei verschiedenen statischen Hintergrundfeldern $\mu_0 H_{\text{mag}}$ von 0 μT bis 400 μT aufgenommen. Die relative Höhe des Magnetisierungsfelds $\mu_0 H_{\text{mag}}$ mit der Dauer von 2 Sekunden betrug bei jeder Messung 1,5 mT. Um den Offset des Hintergrundfelds später abziehen zu können, wurde vor dem 1,5 mT-Magnetisierungspuls das Streufeld der Probe im Hintergrundfeld 50 ms lang gemessen. Dieser Messablauf ist in Abbildung 3.11(a) gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 3.11(b) sind die Relaxationskurven um den Offset des Hintergrundfelds korrigiert dargestellt. Der Offset konnte nicht vollständig anhand des Streufelds der Probe im Hintergrundfeld abgezogen werden, da 50 ms nicht ausreichen, die Nanopartikel nach der Langevin-Funktion auszurichten. Es ist dennoch ein Unterschied zwischen den Zeitkonstanten der Relaxationskurven zu erkennen. Je höher das statische Hintergrundfeld ist, desto schneller erfolgt die Relaxation. Eine Kurvenanpassung mit der phänomenologischen logarithmischen Funktion (1.42) ergibt Zeitkonstanten von $\tau_{N,0 \mu T} = 1,17 \text{ s}$ bis $\tau_{N,400 \mu T} = 0,82 \text{ s}$. Für die Bestimmung der Strukturparameter von magnetischen Nanopartikeln muss dies berücksichtigt oder für eine Abschirmung des Hintergrundfelds gesorgt werden.

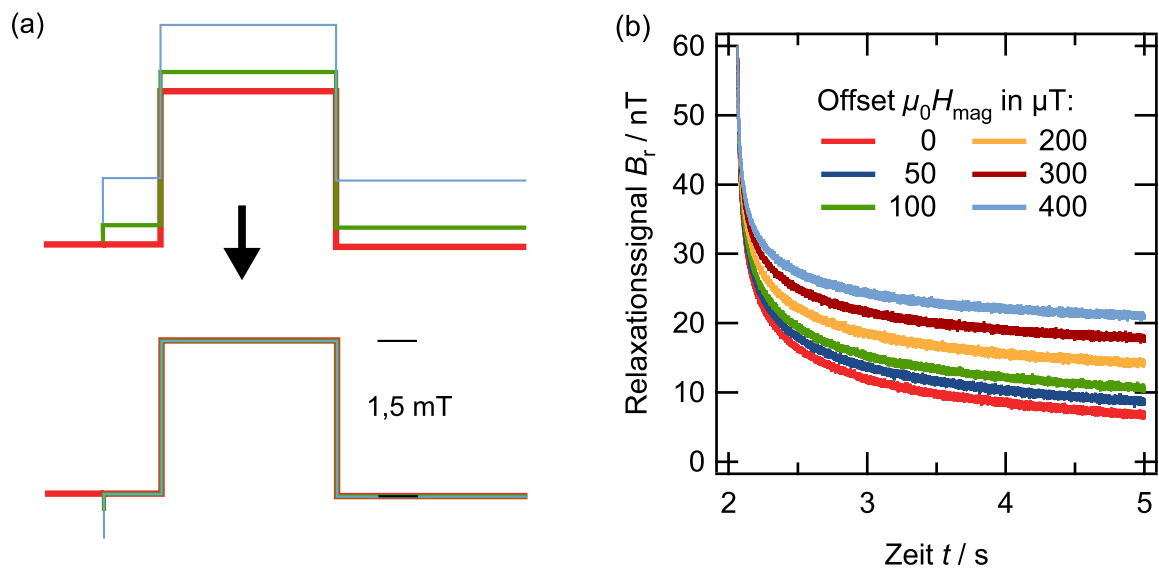


Abb. 3.11 – (a) Skizze der Hintergrundfeldmessung, (b) Relaxationskurven bei verschiedenen Hintergrundfeldern.

3.4 Untersuchungen für die Methodenvvalidierung eines Bindungsnachweises

3.4.1 Validierungsdaten

In diesem Abschnitt sollen Validierungsdaten ermittelt werden, die für einen Bindungsnachweis über immobilisierte superparamagnetische Nanopartikel als Marker gültig sind. Eine häufige Fragestellung einer Anwendung ist der Anteil von superparamagnetischen Nanopartikeln, die nur nach dem Néel-Mechanismus relaxieren können. Dies ist z.B. der Fall bei einem Festphasenassay oder bei einer Bindung an einen μm -großen Analyten (Kapitel 5.3 „Immobilisierung von Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln an biotinylierten Agarose-Beads“) oder durch Einbettung in eine feste Matrix (Kapitel 5.5 „Charakterisierung von Hydrogelen“). Mit Messungen an einer Verdünnungsreihe von immobilisierten superparamagnetischen Nanopartikeln fluidMAG-12/AS (Charge C) wurden hierzu wichtige Validierungsdaten bestimmt. Da es keine zertifizierten Referenzproben zur magnetischen Relaxationsmessung gibt, wurden 810 μL jeder Verdünnung hergestellt und daraus 4 150 μL -Proben mittels Gefriertrocknung präpariert. Die Proben mit dem homogensten Erscheinungsbild wurden ausgewählt. Mit dieser Referenzverdünnungsreihe wurden aus laborinternen Wiederholmessungen wichtige Validierungsdaten bestimmt. Sie wurden mit Standardmessparametern für immobilisierte Proben gemessen:

- Hintergrundmessung vor der Probenmessung
- 2 Sekunden bei einer Magnetflussdichte von 2 mT magnetisieren und messen
- 1,5 Sekunden bei ausgeschaltetem Magnetfeld messen
- 10 Sekunden Pause
- 20 Wiederholmessungen

Kalibrierproben und Selektivität

Ein wichtiger Unterschied der immobilisierten Verdünnungsreihe zu einem Einsatz der Nanopartikel in homogenen Assays ist das gleichzeitige Vorhandensein von mobilen Nanopartikeln. Wie in Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3 noch gezeigt wird, kann die Anwesenheit von mobilen Nanopartikeln zu Beginn der Immobilisierung einen höheren Anteil an gebundenen Nanopartikeln vortäuschen. In diesem Bereich wird die Selektivität des Verfahrens geringer.

Kalibrierkurve, Arbeitsbereich und Linearität

Abbildung 3.12 zeigt die Kalibrierkurve der Referenzverdünnungsreihe über einen weiten Bereich des Eisengehalts von 7,5 nmol bis 61000 nmol in 150 μL -Probenvolumen. Die Relaxationskurven der einzelnen Verdünnungen wurden wiederholt gemessen und mit Hilfe der phänomenologischen logarithmischen Funktion (1.42) angepasst. Aufgetragen ist der Mittelwert \ln -Amplituden $B_{0,N}$ aus maximal 6 Messungen. Aufgrund der

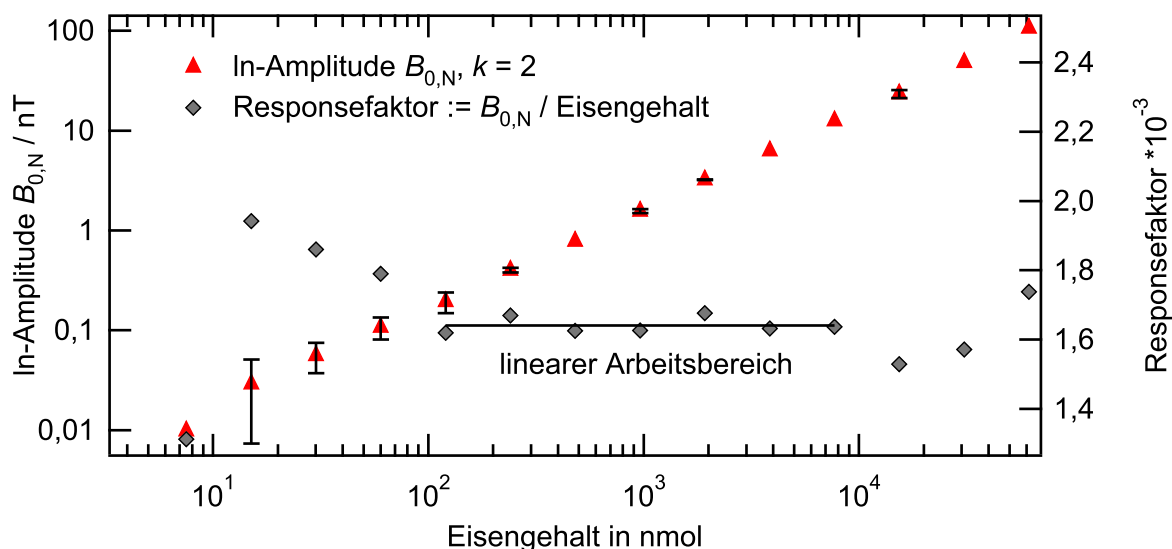


Abb. 3.12 – Kalibrierkurve und Linearität der immobilisierten Referenzverdünnungsreihe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge C).

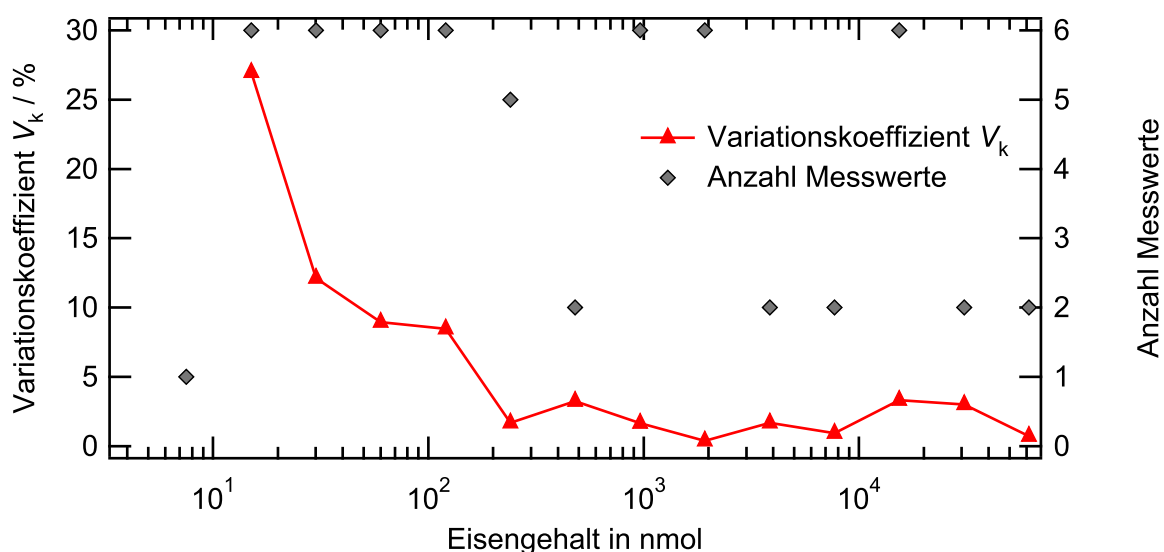


Abb. 3.13 – Variationskoeffizienten der immobilisierten Referenzverdünnungsreihe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge C).

geringen Größe der Standardabweichung ist die erweiterte Standardabweichung mit dem entsprechenden Student-Faktor für ein Vertrauensniveau von 95 % eingetragen. Die genaue Anzahl von Wiederholmessungen ist Abbildung 3.13 zu entnehmen. Um die Linearität der Kalibrierkurve zu bestimmen, wurde der Responsefaktor als Quotient aus In-Amplitude $B_{0,N}$ und Eisengehalt berechnet, der bei linearem Zusammenhang konstant ist. Im linearen Arbeitsbereich von 120 nmol bis 7700 nmol Eisen beträgt die Differenz

der Responsefaktoren maximal 3,5 %. Die untere Grenze des linearen Arbeitsbereichs wird durch die Messunsicherheit des Systems bestimmt. Die obere Grenze des linearen Arbeitsbereichs sollte erst bei viel höherem Eisengehalt durch Sättigung der Magnetfeldsensoren des Messsystems beschränkt sein. Der Unterschied der Responsefaktoren kann durch Präparationsfehler, Probenposition, geringe Anzahl der Messungen oder Wechselwirkung der Nanopartikel bei hohen Konzentrationen verursacht werden.

Wiederholpräzision

In Abbildung 3.13 sind die Variationskoeffizienten V_k für die Proben der immobilisierten Verdünnungsreihe eingetragen. Der Variationskoeffizient ist in diesem Fall ein Maß für die Präzision bei Wiederholmessungen an der gleichen Probe und Bestimmung der Amplitude $B_{0,N}$ mit der phänomenologischen logarithmischen Funktion (1.42). Mit der Festlegung einer oberen Grenze für den Variationskoeffizienten kann vorgegeben werden, ab welchem Eisengehalt das Messverfahren zuverlässig angewandt werden kann.

Berechnung Nachweis-, Erfassung-, Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

In der DIN 32645 [114] sind für die chemische Analytik die Begriffe Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze festgelegt. Die Nachweisgrenze ist als die kleinste qualitativ nachweisbare Menge und die Erfassungsgrenze als die kleinste quantifizierbare Menge definiert. Die Bestimmungsgrenze ist definiert als der kleinste Gehalt an Analyt, der mit einer gegebenen minimalen relativen Ergebnisunsicherheit bestimmt werden kann. Die drei Grenzen können mit der Leerwert- als auch mit der Kalibriergeradenmethode ermittelt werden. Die Leerwertmethode ist bei der Auswertung von Relaxationsdaten mit der Kurvenanpassung von Modellfunktionen nicht anwendbar. Daher werden die Grenzen mit der Kalibrierwertmethode bestimmt, für die folgende Voraussetzungen gefordert sind:

- Linearer Zusammenhang zwischen der Messgröße und dem Analytgehalt
- Normalverteilung der Messwerte
- Varianzhomogenität.

Für die Auswertung wurden die Kalibrierproben mit einem Eisengehalt zwischen 15 nmol und 2000 nmol doppelbestimmt. Die Messdaten sind in diesem Bereich normalverteilt, ausreißerfrei (F-Test, 95 %) und können linear (Mandel-Test, 99 %) ausgewertet werden. Die Varianzhomogenität ist zwischen der Referenzprobe mit 15 nmol Eisengehalt und 2000 mol Eisengehalt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,03$ gegeben. Die Empfehlung von 10 Messdaten in einem Konzentrationsbereich, der maximal den Faktor 10 überdeckt, ist mit den Messdaten aus der Kalibrierkurve (Abb. 3.12) nicht erfüllt. Die ermittelten Ergebnisse werden in einem solchen Fall aufgrund der Verschiebung des Schwerpunkts der Anpassgeraden überschätzt. Eine Auswertung nach DIN 32645 mit den genannten Einschränkungen ergibt für die Grenzen folgende Werte:

- Nachweisgrenze 29,7 nmol Eisen
- Erfassungsgrenze 59,4 nmol Eisen

- Bestimmungsgrenze 109,6 nmol Eisen.

Diese Grenzen sind stark von der Größenverteilung und dem magnetischen Material der eingesetzten Nanopartikel abhängig und gelten daher nur für die hier verwendeten Magnetit-Nanopartikel fluidMAG-12/AS (Charge C). Monodisperse superparamagnetische Nanopartikel, deren Relaxationszeitkonstante mit dem Messsystem erfasst werden kann, tragen alle zum messbaren Relaxationssignal bei. Polydisperse Nanopartikel, bei denen teilweise zu kurze Relaxationszeitkonstanten vorliegen, werden nicht alle zum Messsignal beitragen.

Nachweisgrenze des magnetischen Streufelds in abgeschirmter und unabgeschirmter Umgebung

Allgemein kann für das Messsystem eine Nachweis- und Erfassungsgrenze angegeben werden, die sich auf die Messgröße magnetisches Streufeld B_r während der Relaxationsphase bezieht. Um ein magnetisches Streufeld detektieren zu können, muss sich das Messsignal aus dem Rauschen des Messsystems abheben. Nach DIN 32645 [114] ist ein Analyt nachgewiesen, wenn der Mittelwert der Analytmessung vom Mittelwert des Leerwerts zwei Standardabweichungen des Leerwerts entfernt liegt. Für die Erfassungsgrenze ist ein 3-facher Abstand der Standardabweichungen definiert. Für die Messungen von Relaxationsverläufen kann dies wie folgt übertragen werden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird eine Leermessung aufgenommen. Dann wird die Standardabweichung des Rauschens aus der Leermessung bestimmt. In Tabelle 3.4 sind Spitze-Spitze-Werte B_{SS} der Leermessungen und die Standardabweichung für das Differenzsignal der Abschirmkammermessung aufgelistet. Die Rauschamplitude ist in der Abschirmkammer normalverteilt mit einer Standardabweichung von $s = 47$ pT. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von $2 \cdot s = 94$ pT und einer Erfassungsgrenze von $4 \cdot s = 188$ pT. Die Messwerte außerhalb der Abschirmkammer sind aufgrund externer Störungen nicht mehr normalverteilt. Ungeachtet dessen lässt sich aus diesen Messwerten die Nachweisgrenze abschätzen. Sie ist bei der Betrachtung des Differenzsignals von 20 Mittelungen etwa um den Faktor 4 höher als in der Abschirmkammer.

Bei idealer elektromagnetischer Abschirmung des Systems lässt sich der Spitze-Spitze-Wert B_{SS} aus dem Flussdichterauschen der Sensoren berechnen. Für die benutzten Fluxgate-Sensoren mit einer Bandbreite von 3000 Hz und einem Flussdichterauschen von $3 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}}$ ist dieser mit einem Crest-Faktor von 4

$$B_{SS} = 2 \cdot 4 \cdot 3 \text{ pT}/\sqrt{\text{Hz}} \cdot \sqrt{3000 \text{ Hz}} = 1400 \text{ pT}. \quad (3.6)$$

Für thermisches Rauschen berücksichtigt der Crest-Faktor, der Verhältnis vom Spitzenwert zum Effektivwert ist, Messwerte, die wenigstens 0,01 % der Zeit auftreten [115]. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Messergebnissen für eine Messung in der Abschirmkammer.

Tab. 3.4 – Spitze-Spitze-Werte B_{SS} der Leermessungen mit einem Crest-Faktor von 4.

	Fluxgate 1	Fluxgate 2	Differenz	s
in Ak3B				
1 Messung B_{SS} / pT	1762	1832	1594	—
20 Messungen B_{SS} / pT	404	400	382	47 pT
ohne Abschirmung				
1 Messung B_{SS} / nT	65,4	66,4	5,8	—
20 Messungen B_{SS} / nT	25,6	26,0	1,7	—

3.4.2 Einfluss der mathematischen Auswertung

Eine weitere Unsicherheitsquelle bei der Bestimmung eines Analytgehalts aus einer Messgröße ist die Auswertung mit einem mathematischen Modell. Die Genauigkeit einer mathematischen Auswertung wird z.B. durch das Signal-Rausch-Verhältnis der Messdaten oder durch ein mathematisches Modell, das idealisierte Eigenschaften voraussetzt, begrenzt. Im Folgenden wird die mathematische Bestimmung des gebundenen Anteils von magnetischen Nanopartikeln mit Hilfe des phänomenologischen Superpositions-Modells (1.48) betrachtet. Ändern magnetische Nanopartikel ihr Relaxationsverhalten in einem Bindungsnachweis vom Brownschen zum Néelschen Mechanismus, kann der gebundene Anteil von Nanopartikeln im einfachsten Fall über die Anpassung der Relaxationskurven mit der phänomenologischen logarithmischen Funktion (1.42) bestimmt werden. Dies setzt voraus, dass die Relaxation der mobilen magnetischen Nanopartikel nicht ins Messfenster fällt. Ist dies durch eine breite Größenverteilung der magnetischen Nanopartikel oder eine hohe Viskosität des umgebenden Mediums nicht gegeben, muss mit dem phänomenologischen Superpositions-Modell (1.48) der Anteil von gebundenen Nanopartikeln bestimmt werden. Ist das Verhältnis von ungebundenen zu gebundenen Nanopartikeln zu groß, können ungebundene magnetische Nanopartikel das Relaxationssignal dominieren.

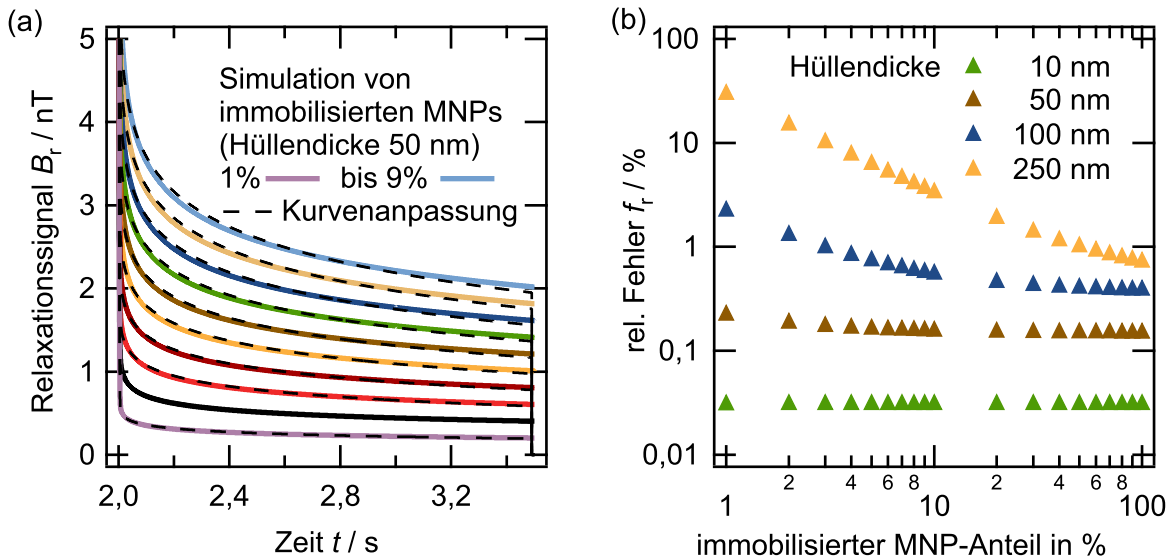


Abb. 3.14 – Einfluss der mathematischen Auswertung auf einen Bindungsnachweis für verschieden große Nanopartikel:

(a) Relaxationskurven für Anteile von 1 % bis 9 % gebundener Nanopartikel (Hüllendicke 50 nm).

(b) Relativer Fehler des Anteils an gebundenen Nanopartikeln aus Kurvenanpassung mit (1.48): $B_{\text{immobilisiert}}$ und $B_{\text{ungebunden}}$ unabhängig, $B_{\text{Offset}} = 0$.

Simulationsdurchführung

Um zu untersuchen, wie zuverlässig die Kurvenanpassung mit dem phänomenologischen Superpositions-Modells (1.48) den gebundenen Anteil bestimmen kann, wurden Relaxationskurven mit unterschiedlichen Anteilen an gebundenen Nanopartikeln und verschiedenen hydrodynamischen Durchmessern simuliert. Dabei sind gebundene Nanopartikel vollständig an eine Gefäßwand oder einen großen Analyten immobilisiert. Mit der Software zur Datenauswertung und Simulation aus Kapitel 2.3 wurde für die Kernparameter $\mu_K = 2,04$, $\sigma_K = 0,4$, $M_S = 370000$ kA/m und $K = 5000$ J/m³ mit dem Momenten-Superpositions-Modell (1.37) eine Néel-Referenz für immobilisierte Nanopartikel berechnet. Mit diesen Kernparametern wurden Brown-Referenzen über das Cluster-Momenten-Superpositions-Modell (1.38) für die konstanten Hüllendicken 10 nm, 50 nm, 100 nm und 250 nm berechnet. Mit den beiden Referenzkurven wurden für jede Hüllendicke Gemische aus immobilisierten und ungebundenen Nanopartikeln in verschiedenen Verhältnissen berechnet. In Abbildung 3.14(a) sind Relaxationskurven für 50 nm Hüllendicke und Gemische mit 1 % bis 9 % immobilisierter Nanopartikel gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

Der immobilisierte Anteil von Nanopartikeln wurde dann mit dem Superpositions-Modell der phänomenologischen Funktionen (1.43) und (1.42) bestimmt. Aus den Referenzkurven werden die unveränderlichen Zeitkonstanten $\tau_{\text{ref,immobilisiert}}$ und $\tau_{\text{ref,ungebunden}}$ sowie der Exponent β bestimmt. Die Amplituden $B_{\text{ref,immobilisiert}}$ und $B_{\text{ref,ungebunden}}$ repräsentieren vollständig immobilisierte sowie vollständig ungebundene Nanopartikel. In Abbildung 3.14(a) sind die Kurvenanpassungen mit dem Superpositions-Modell (1.48) gestrichelt gezeigt. Dabei wurden die Amplituden $B_{\text{immobilisiert}}$ und $B_{\text{ungebunden}}$ unabhängig gelassen. Der Offset B_{Offset} wurde Null gesetzt, da die simulierten Kurven keinen Offset besitzen. In Abbildung 3.14(b) sind die relativen Fehler der Bestimmung des immobilisierten Anteils aller simulierten Gemische gezeigt. Größere hydrodynamische Durchmesser und geringere Anteile an immobilisierten Nanopartikeln ergeben bei der Auswertung einen größeren relativen Fehler, da sich die Relaxationskurven von immobilisierten und ungebundenen Nanopartikeln nicht mehr deutlich voneinander unterscheiden. Der relative Fehler ist unter den simulierten Bedingungen für Nanopartikel mit hydrodynamischen Durchmessern von 100 nm bis 200 nm, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, gering. Ein größerer relativer Fehler ist bei zusätzlichem Rauschen der Messdaten zu erwarten.

3.4.3 Experimentelles Modell

In Kapitel 1.6 wurde beschrieben, wie gebundene magnetische Nanopartikel von ungebundenen Nanopartikeln bei dem Magnet-Relaxations-Immunoassay messtechnisch unterschieden werden können. Der folgende Versuch soll experimentell die Überlagerung der Relaxationssignale von ungebundenen und gebundenen Nanopartikeln unter kontrollierten Bedingungen demonstrieren. Mit der analytischen Auswertung durch das Superpositions-Modell der phänomenologischen Funktionen (1.43) und (1.42) soll dann der Anteil von gebundenen Nanopartikeln bestimmt werden.

Versuchsdurchführung

Für den Versuch wurden Probengefäße mit zwei Kammern gefertigt. Abbildung 3.15 zeigt die drei durchgeführten Messungen mit den dazugehörigen Relaxationskurven. Die Kammern der Probengefäße in Abbildung 3.15(a) waren dabei jeweils einem Fluxgate-Sensor zugewandt. In den ersten beiden Schritten wurden Referenzproben für vollständig immobilisierte und für vollständig ungebundene Nanopartikel präpariert. Zuerst wurden in die rechte Kammer eines Probengefäßes 75 μL des Ferrofluids fluidMAG-GA/GV gefüllt und als Brown-Referenz gemessen. Im zweiten Schritt wurde das Probengefäß mit einem anderen Probengefäß getauscht. In diesem sind in der linken Kammer 75 μL Ferrofluid fluidMAG-GA/GV gefriergetrocknet worden. Die Messung der Relaxation dient als Néel-Referenz. Für das darauffolgende experimentelle Modell eines Bindungsnachweises verblieb das Probengefäß im Messsystem, und die rechte Kammer wurde mit 75 μL fluidMAG-GA/GV gefüllt. Das gemessene Relaxationssignal entspricht einer Addition der beiden Referenz-Messungen. Alle Proben wurden mit den Standardparametern für immobilisierte Ferrofluide gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Der Anteil von gebundenen und ungebundenen Nanopartikeln wurde, wie im Kapitel 1.6.2 beschrieben, aus den Relaxationskurven aus Abbildung 3.15(b) bestimmt. Im Unterschied zu einem realen Bindungsnachweis wurden die Amplituden der Brown- und Néel-Referenz auf einen Anteil von jeweils 50 % festgelegt. Dies entspricht einer Probe, in der die eine Hälfte der Nanopartikel immobilisiert und die andere Hälfte ungebunden ist. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Um den Einfluss der Mittelung zu untersuchen, wurde auch jeweils die erste und die

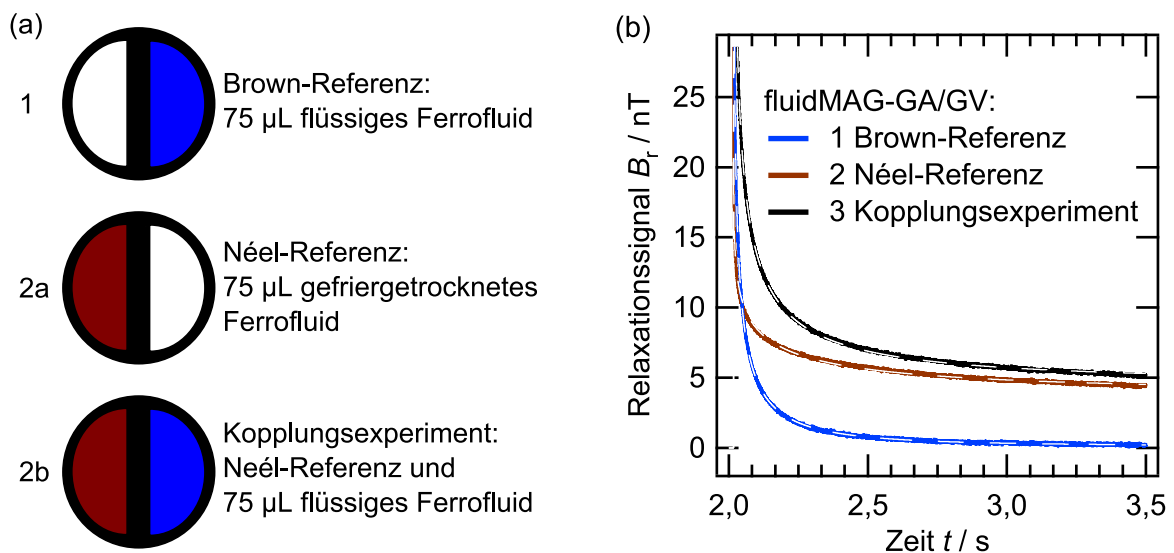


Abb. 3.15 – Experimentelles Modell eines Bindungsnachweises:

- (a) Skizze,
- (b) Relaxationskurven.

letzte der 20 Messungen ausgewertet. Während sich die Relaxationskurven durch die unterschiedlichen magnetischen Vorgeschichten unterscheiden, ist die Auswertung der Anteile stabil. Die bestimmten Anteile gebundener Nanopartikel sind etwas kleiner als die präparierten 50 % gebundener Nanopartikel. Dies ist hauptsächlich durch den großen hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel der ungebundenen Brown-Referenz begründet. Ihre Relaxationszeitkonstante von 200 ms ist deutlich zu erkennen. Eine erste Abschätzung über die Brownsche Zeitkonstante (1.23) ergibt einen mittleren Durchmesser von 800 nm. Die Ergebnisse bestätigen die theoretischen Untersuchungen im vorherigen Abschnitt, dass bei großem hydrodynamischen Durchmesser die Unsicherheit bei der Bestimmung von gebundenen Nanopartikeln größer wird. Die Summe an gebundenen und ungebundenen Nanopartikeln ergibt nicht mehr 100 %.

Tab. 3.5 – Ergebnisse des experimentellen Modells eines Bindungsnachweises.

nominell	Experiment		
	20 Mittelungen	1. Messung	20. Messung
gebunden (50 %)	46,5 %	45,8 %	46,2 %
ungebunden (50 %)	52,3 %	52,8 %	52,4 %

3.5 Ermittlung der Gesamtunsicherheit

Zur Ermittlung der Gesamtunsicherheit des Messsystems wurden zuerst die Messgrößen spezifiziert und die entscheidenden Prozessgleichungen aufgestellt. Danach wurden die für das MRX-Forschungssystem relevanten Unsicherheitsquellen identifiziert und quantifiziert. Aus den Prozessgleichungen lässt sich ableiten, dass der mechanische Aufbau des Messsystems einen großen Einfluss auf die Messunsicherheit hat. Insbesondere die senkrechte Ausrichtung der Fluxgate-Sensoren zum Magnetisierungsfeld verursacht den größten Unsicherheitseinfluss. Da der mechanische Einfluss von Probenwechseln, die Probenposition und die Ausdehnung des Messaufbaus bei Temperaturänderungen die größten Unsicherheitseinflüsse sind, konnte aufgrund der Komplexität dieser Einflüsse die Gesamtunsicherheit nicht mit dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ("bottom up"-Verfahren) durchgeführt werden. Die Gesamtunsicherheit wurde stattdessen mit den im letzten Abschnitt beschriebenen Standardmessungen von drei homogenen Referenzproben und Hintergrundmessungen nach dem „top down“-Verfahren abgeschätzt [107, 108]. Die entscheidenden Unsicherheiten können der Tabelle 3.3 entnommen werden. Für das Messsystem alleine sind die Unsicherheiten der Hintergrundmessung zu berücksichtigen. Die bestimmte Messunsicherheit der Hintergrundmessung von $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,mag}} = 2,96 \text{ nT}$ während der Magnetisierung und $\delta B_{\text{Hintergrundmessung,Differenz,rel}} = 0,06 \text{ nT}$ während der Relaxation (Tabelle 3.2) begrenzt die messbare absolute magnetische Flussdichte einer Probe. Der Unsicherheitseinfluss der Probenhomogenität und Probenposition kann während der Magnetisierungsmessung und der Relaxationsmessung für verschiedene Probenkonzentrationen entnommen werden. Wie sich in den folgenden Abschnitten und im Kapitel 5 herausstellen wird, hat die Probenpräparation und Probenhomogenität den entscheidenden Einfluss auf die Messunsicherheit beim Fluxgate-MRX-Verfahren.

4

Charakterisierung von Ferrofluiden

In diesem Kapitel wird das Ferrofluid fluidMAG-12/AS der Charge B mit mehreren Charakterisierungsmethoden untersucht. Abbildung 4.1 zeigt, welche Parameter mit den einzelnen Methoden bestimmt werden können und wie diese Informationen in andere Methoden einfließen.

Die Größenverteilung der magnetischen Kerne $f(\mu_K, \sigma_K)$ wurde mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Magnetisierungs- (M(H)) und Magnetrelaxometrie-messungen (MRX) bestimmt. Die Sättigungsmagnetisierung M_S der magnetischen Nanopartikel wurde aus Magnetisierungsmessungen bestimmt und dann in der Auswertung der Magnetrelaxometriedaten benutzt, um die effektive Anisotropiekonstante K_{eff} zu bestimmen. Die Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers $f(\mu_h, \sigma_h)$ wurde mit der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), AC-Suszeptibilität (AC- χ) und Magnetrelaxometrie (MRX) bestimmt, wobei in die letzten beiden die Kerneigenschaften $f(\mu_K, \sigma_K)$ und K_{eff} der Nanopartikel einfließen.

Abschließend werden die Ergebnisse der Methoden miteinander verglichen und Anwendungsmöglichkeiten der Magnetrelaxometrie diskutiert.

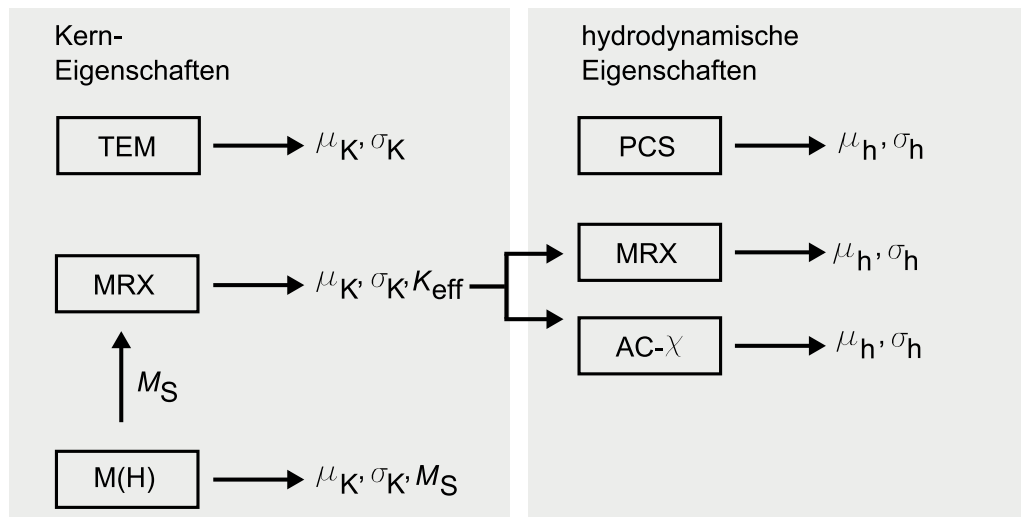


Abb. 4.1 – Schema der Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln.

4.1 Mikroskopische Methoden

4.1.1 REM

Wie in Abschnitt 1.4 erläutert, eignet sich die Rasterelektronenmikroskopie zur ersten Abschätzung der Größe und Form der Nanopartikel inklusive ihrer Hülle. In den Abbildungen 4.2 und 4.3 sind zwei REM-Aufnahmen von unterschiedlichen Eisenoxid-Ferrofluiden mit einer Maßstabsleiste von 100 nm gezeigt. Beide Ferrofluide wurden auf einem Silizium-Substrat präpariert und getrocknet. Beim Trocknungsprozess kann die Polymerhülle schrumpfen, so dass keine verlässlichen Aussagen über die hydrodynamische Größe der Nanopartikel im suspendierten Zustand getroffen werden können. In Abbildung 4.2 ist das Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Magnetit, chemicell GmbH, Deutschland) mit einer Polyacrylsäurehülle gezeigt. Es ist mit Charge A bezeichnet. Die weiteren Messungen in diesem Kapitel sind alle mit einer späteren Lieferung dieses Ferrofluids der Charge B durchgeführt worden. In der Abbildung 4.2 sind agglomerierte Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm zu sehen. Ob die Agglomeration der Nanopartikel auch im flüssigen Zustand vorhanden oder durch die Probenpräparation hervorgerufen worden ist, lässt sich aus den Bildern nicht erkennen. Ihre Oberfläche ist eben und ihre Form ist regelmäßig und kugel- bis würfelförmig. In Abbildung 4.3 ist das Ferrofluid DDM 128N (Maghemite, Meito Sangyo, Japan) mit einer Hülle aus Carboxydextran [81] abgebildet. Die Agglomerate sind im Vergleich zur Abbildung 4.2 kleiner und die Form der einzelnen Nanopartikel ist unregelmäßiger.

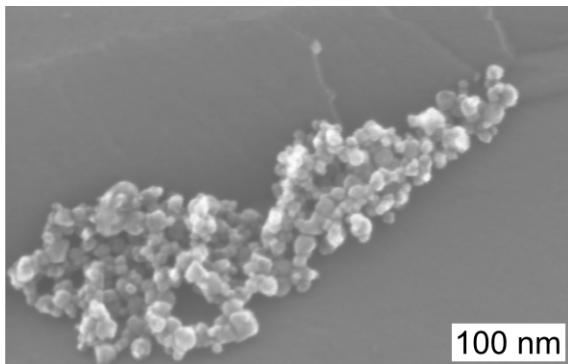


Abb. 4.2 – Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge A). Länge der Maßstabsleiste 100 nm.

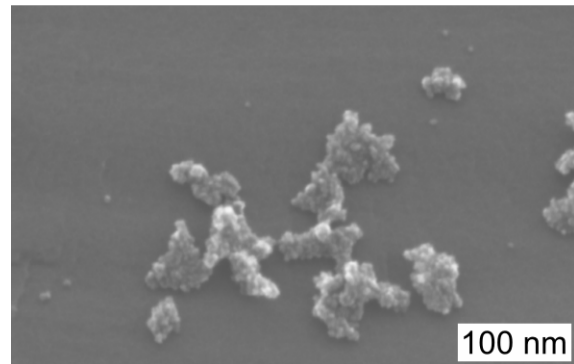


Abb. 4.3 – Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme des Ferrofluids DDM 128N. Länge der Maßstabsleiste 100 nm.

4.1.2 TEM

Die Transmissionselektronenmikroskopie kann verwendet werden, um die Kerngrößen eines Ferrofluids zu bestimmen. Durch das Abbildungsprinzip (Abschnitt 1.4) werden die magnetischen Kerne hervorgehoben. In der Abbildung 4.4 sind zwei TEM-Aufnahmen des Ferrofluids 12/AS Charge B in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt. Sie wurden am HZI, Braunschweig, von Herrn Dr. Lünsdorf aufgenommen. Wie bei REM-Aufnahmen kann nicht entschieden werden, ob die abgebildeten Agglomerate aufgrund der Trocknung während der Probenpräparation entstanden sind. Mit Hilfe der Abbildung 4.4(b) und des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ [116] wurde der Durchmesser von 411 Kernen bestimmt. Das Histogramm der Kerndurchmesser und die Kurvenanpassung mit einer logarithmischen Normalverteilung ist in Abb. 4.4(c) gezeigt.

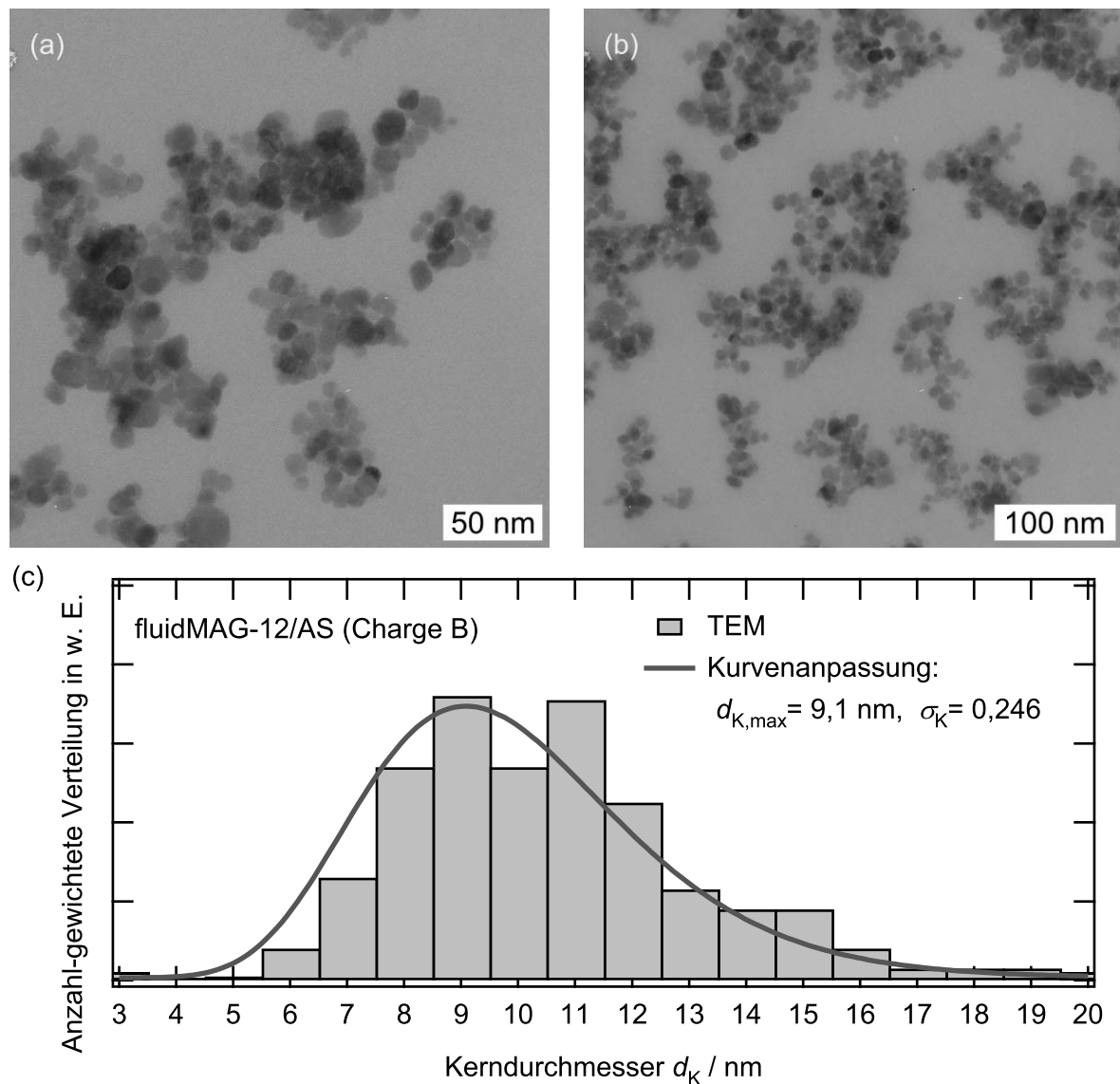


Abb. 4.4 – Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B). Länge der Maßstabsleiste (a) 50 nm, (b) 100 nm. (c) Histogramm der Kerngrößenverteilungen der TEM-Aufnahme (b).

4.2 Integrale Methoden

4.2.1 Magnetische Gleichfeld-Suszeptibilität

Die $M(H)$ -Messungen wurden mit einem Quantum Design Magnetometer-System an der PTB Braunschweig bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) ist für die Messung in einer gefriergetrockneten D-Mannit-Lösung immobilisiert worden, um zu überprüfen, ob intrinsischer Superparamagnetismus vorliegt. In Abbildung 4.5 ist die Abhängigkeit der Magnetisierung, bezogen auf den Magnetitgehalt des Ferrofluids, in einem Bereich von $-4,5$ T bis $4,5$ T gezeigt. Die Magnetisierungskurve zeigt aufgrund des superparamagnetischen Verhaltens der Kerne keine Hysterese. Sie kann über die Langevin-Funktion in Verbindung mit einer logarithmischen Normalverteilung (1.21) der Kerne angepasst werden. Aus der Einwaage des Magnetitgehalts lassen sich hiermit die Sättigungsmagnetisierung M_S und Größenverteilung f der Kerne der Nanopartikel bestimmen: Sättigungsmagnetisierung $M_S = 350000$ A/m, Maximum der Verteilung $d_{K,max} = 4,9$ nm, Breite der Verteilung $\sigma_K = 0,437$.

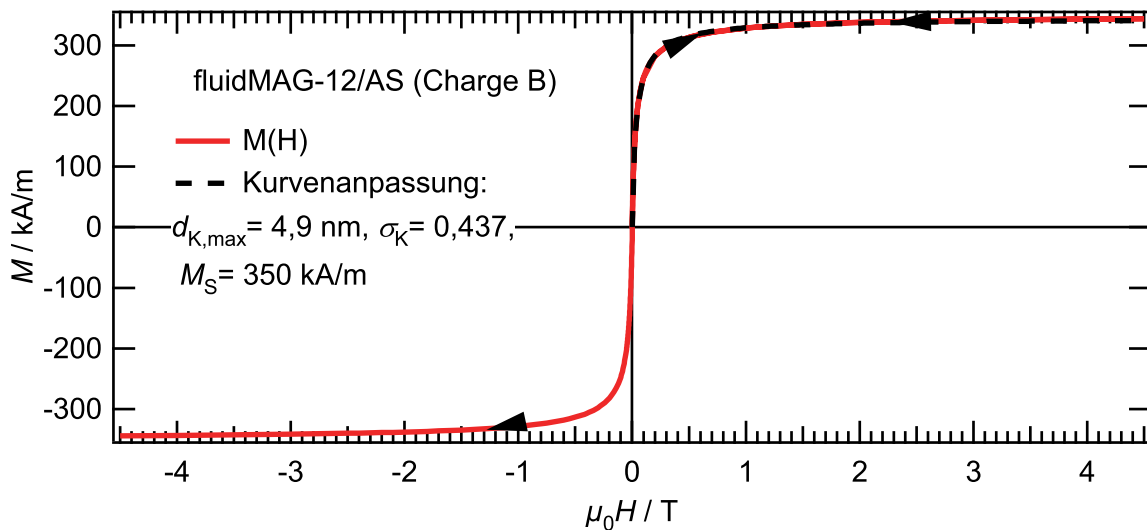


Abb. 4.5 – Messung der Magnetisierungskurve des immobilisierten Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B).

4.2.2 Magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität

An einer flüssigen Probe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) wurde die magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität gemessen (Abschnitt 1.4 magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität). Als Messaufbau diente ein am Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik entwickelter Messplatz [117]. Die Probe befindet sich in einer von zwei antiseriell geschalteten Sekundärspulen. In dieser Anordnung wird mit einer Primärspule ein schwaches sinusförmiges magnetisches Wechselfeld von $250 \mu\text{T}$ erzeugt, das mit einer Frequenz von 5 Hz bis 40 kHz variiert werden kann. Mit dem induzierten Signal in den Sekundärspulen wird die Wechselfeld-Suszeptibilität χ errechnet. Abbildung 4.6 zeigt den Real- und Imaginärteil der Wechselfeld-Suszeptibilität χ' und χ'' . Eine Kurvenanpassung mit den Gleichungen (1.46) und (1.47) ergibt für eine logarithmische Normalverteilung des hydrodynamischen Durchmessers $d_{h,\max} = 85 \text{ nm}$ und $\sigma_h = 0,372$. Dabei wurden die Kerneigenschaften $d_{K,\max}$, σ_K und K_{eff} aus den Magnetrelaxometriedaten und die Sättigungsmagnetisierung M_S aus der Magnetisierungskurve verwendet.

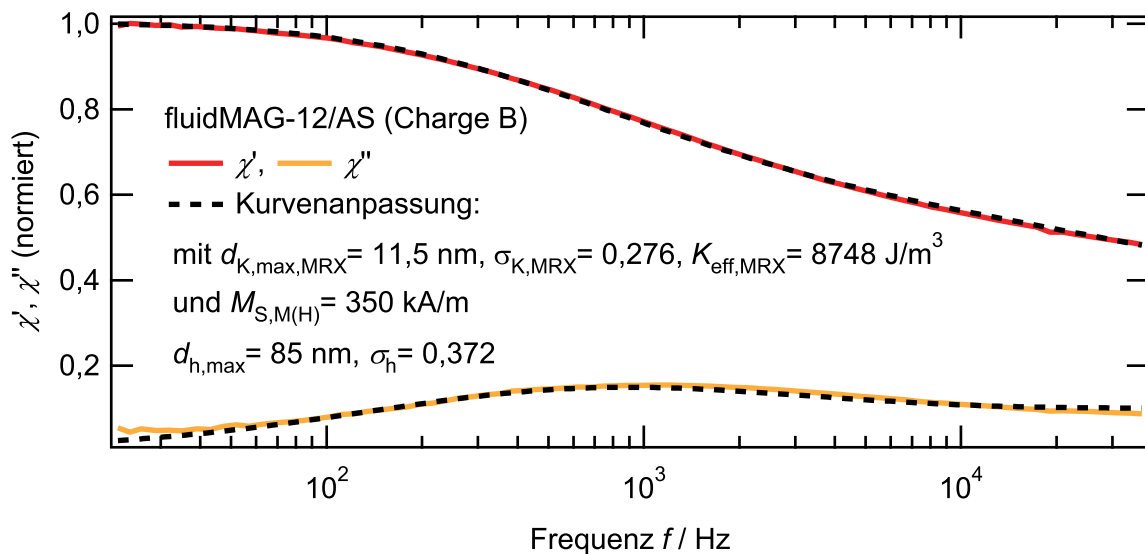


Abb. 4.6 – AC-Suszeptibilitätsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem am Institut aufgebauten Messplatz.

4.2.3 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Messung der Photonenkorrelationsspektroskopie an dem flüssigem Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) wurde am Institut für Partikeltechnik der TU Braunschweig mit einem Nanophox 50 der Firma Sympatec GmbH durchgeführt. Das Nanophox-Gerät besitzt zwei Fotodetektoren, mit denen der Einfluss der Mehrfachstreuung bei der Messung verringert werden kann. Über die Kreuzkorrelation der gemessenen Intensitäten der zwei Detektoren können identische Anteile herausgefiltert und die Mehrfachstreuung fast vollständig eliminiert werden. Dadurch wird zum einen die Verfälschung der Messergebnisse durch die Mehrfachstreuung eliminiert und zum anderen die Messung in konzentrierteren, trüben und farbigen Suspensionen ermöglicht. Die Messdaten wurden mit der Methode der zweiten Kumulante der Gerätesoftware ausgewertet [118, 119]. Abbildung 4.7 zeigt die anzahl-gewichtete Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers. Eine Anpassung mit einer logarithmischen Normalverteilung ergibt für den Durchmesser beim Maximum der Größenverteilung $d_{h,max} = 102 \text{ nm}$ mit einer Breite von $\sigma_h = 0,147$. Die Herstellerangabe für den mittleren hydrodynamischen Durchmesser des Ferrofluids sind 100 nm. Die Bestimmung wurde ebenfalls mit der Photonenkorrelationsspektroskopie durchgeführt. Beide Messungen stimmen sehr gut überein.

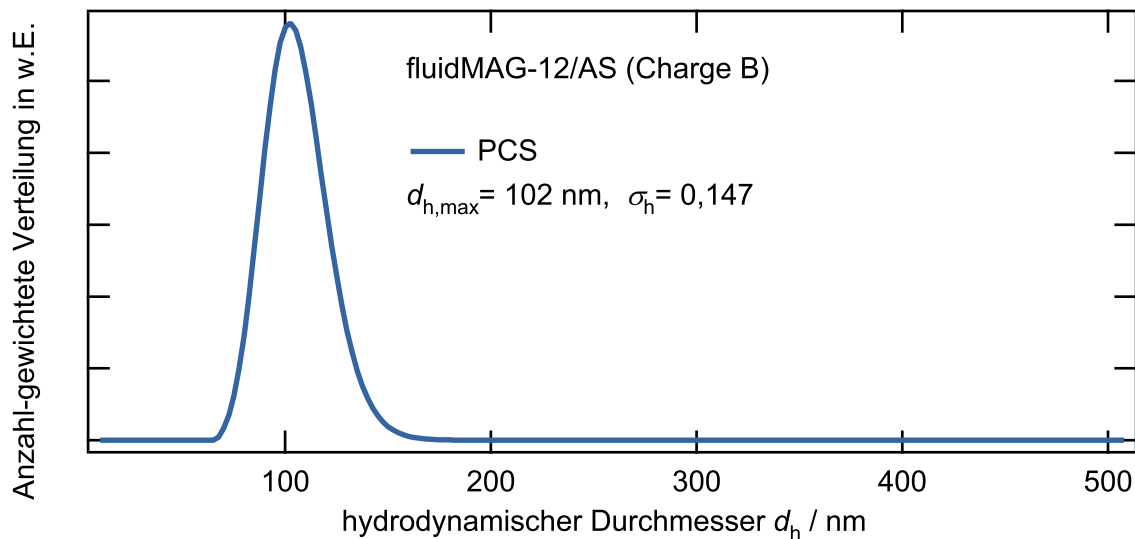


Abb. 4.7 – Anzahl-gewichtete hydrodynamische Größenverteilung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) bestimmt mit Photonenkorrelationsspektroskopie.

4.2.4 Magnetrelaxometrie

Die Magnetrelaxometriemessungen wurden mit dem in dieser Arbeit aufgebauten MRX-Forschungssystem gemessen.

Kerndurchmesser und effektive Anisotropiekonstante

Mit dem Verfahren der Magnetrelaxometrie können Kerneigenschaften von Nanopartikeln charakterisiert werden, wenn diese immobilisiert vorliegen und nur die Néelsche Relaxation möglich ist. Für die Bestimmung der Kerngrößenverteilung und der effektiven Anisotropiekonstanten K_{eff} wurden 150 μL Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) in einer gesättigten D-Mannit-Lösung gefriergetrocknet. Die Messung der Relaxationskurve erfolgte in einem Messzyklus mit den Standardparametern: Aufmagnetisierungsfeld $B_{\text{mag}} = 2 \text{ mT}$, Aufmagnetisierungszeit $t_{\text{mag}} = 2 \text{ s}$, Relaxationszeit $t_{\text{rel}} = 1,5 \text{ s}$. In Abbildung 4.8 ist die Relaxationskurve und die Kurvenanpassung mit dem magnetischen Momenten-Superpositions-Modell (1.37) gezeigt. Für die Kurvenanpassung wurde die Sättigungsmagnetisierung M_S eingesetzt, die aus den Magnetisierungskurven bestimmt worden ist. Für die Kerndurchmesserverteilung ergeben sich unter Annahme einer logarithmischen Normalverteilung die Parameter $d_{K,\text{max}} = 11,5 \text{ nm}$ und $\sigma_K = 0,276$. Für die effektive Anisotropiekonstante erhält man $K_{\text{eff}} = 8748 \text{ J/m}^3$. Eine weitere Möglichkeit, Informationen aus einer Magnetrelaxationsmessung über die Sättigungsmagnetisierung und effektive Anisotropiekonstante zu erhalten, ist die Auswertung von Aufmagnetisierungskurven bei unterschiedlichen äußeren Magnetfeldern H_{mag} . In die magnetfeldabhängige Néel-Zeitkonstante (1.30) geht das Verhältnis K_{eff}/M_S über das reduzierte Feld h ein. Über die Aufspaltung der Aufmagnetisierungskurven bei unterschiedlichen Magnetfeldern kann das Verhältnis K_{eff}/M_S bestimmt werden. Dieses wurde in LuwDIG et al. [51] durchgeführt.

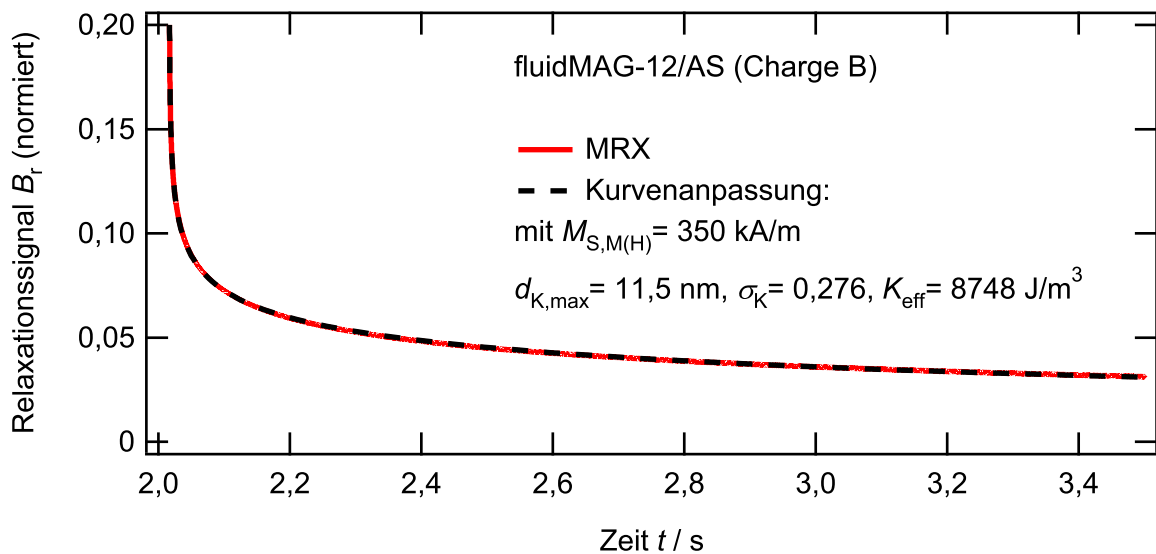


Abb. 4.8 – Relaxationsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem MRX-Forschungssystem und Kurvenanpassung mit dem MSM (1.37).

Hydrodynamischer Durchmesser

Mit dem Verfahren der Magnetrelaxometrie können nicht nur Kerneigenschaften der Nanopartikel bestimmt werden, sondern auch die Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers. Sind die Nanopartikel in der Trägerflüssigkeit suspendiert, können diese je nach Größe nach dem Brownschen und Néelschen Mechanismus relaxieren. Die Relaxationskurven einer Suspension von Nanopartikeln können über das magnetische Cluster-Momenten-Superpositions-Modell (1.38) beschrieben werden. Um die Zahl der Freiheitsgrade zu reduzieren, können zuerst die Kerneigenschaften mit dem magnetischen Momenten-Superpositions-Modell bestimmt werden. Zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der Nanopartikel im Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) wurden Relaxationskurven mit Standardparametern für flüssige Proben durchgeführt und mit dem Cluster-Momenten-Superpositions-Modell und den Kerneigenschaften aus dem vorherigen Abschnitt angepasst. Abbildung 4.9 zeigt die Relaxationskurve der flüssigen Probe, die mit einer viel kürzeren Zeitkonstante relaxiert als die immobilisierte Probe in Abbildung 4.8. Die Kurvenanpassung ergibt für eine logarithmische Normalverteilung des hydrodynamischen Durchmessers ein Maximum bei $d_{h,max} = 95,8 \text{ nm}$ und $\sigma_h = 0,278$.

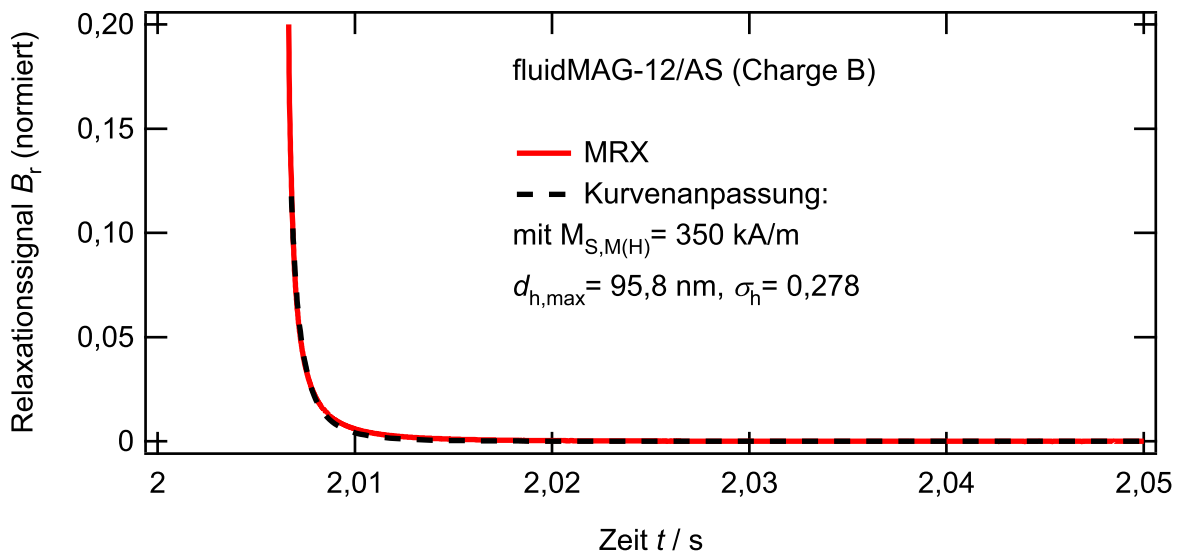


Abb. 4.9 – Relaxationsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem MRX-Forschungssystem und Kurvenanpassung mit dem Cluster-MSM (1.38).

4.3 Vergleich der verwendeten Methoden

In diesem Kapitel wurde mit mehreren Charakterisierungsmethoden das Ferrofluid fluidMAG-12/AS (Charge B) untersucht. In Abbildung 4.10 sind die logarithmisch normalverteilten Kerndurchmesser gezeigt, die mit den Methoden der Transmissionselektronenspektroskopie, Magnetisierungs- und Magnetrelaxationsmessungen bestimmt wurden. Die Bestimmung der Größenverteilung mit TEM-Aufnahmen liefert die genauesten Ergebnisse für die Eisenoxid-Kerngröße. Die ortsabhängigen magnetischen Eigenschaften des Kernmaterials können aus diesen Aufnahmen nicht ermittelt werden. Die kleinere Größe der Kerndurchmesser bei den Magnetisierungsmessungen kann nicht ausschließlich auf eine magnetische Totschicht an der Oberfläche der Kerne zurückgeführt werden, da diese bei Magnetit typischerweise nur 1–2 Nanometer dick ist [120]. Eventuell ist die Näherung im Kurvenanpassungsmodell einer unendlich langen Aufmagnetisierungszeit im Vergleich zur Messzeit für die betrachteten Nanopartikel nicht zulässig, und es muß der zeitabhängige Aufmagnetisierungsprozess berücksichtigt werden. Die Abweichungen bei den MRX-Messungen können auf Wechselwirkungen zwischen den Kernen hindeuten, die den Relaxationsprozess verlangsamen. Die Annahme von Wechselwirkungen der magnetischen Kerne untereinander wird durch die REM-Aufnahme 4.2 und die TEM-Aufnahmen 4.4 unterstützt. Es könnte sich um Multikernpartikel handeln, bei denen mehrere superparamagnetische Kerne in der Polyacrylsäurehülle eingebettet sind. Auch der mittlere hydrodynamische Durchmesser von ca. 100 nm ist bei der Annahme von Multikernpartikeln in Übereinstimmung mit den TEM-Aufnahmen 4.4. In Abbildung 4.11 sind die logarithmisch normalverteilten hydrodynamischen Durchmesser gezeigt, die mit den Methoden der Photonenkorrelationsspektroskopie, AC-Suszeptibilität und Magnetrelaxationsmessungen bestimmt

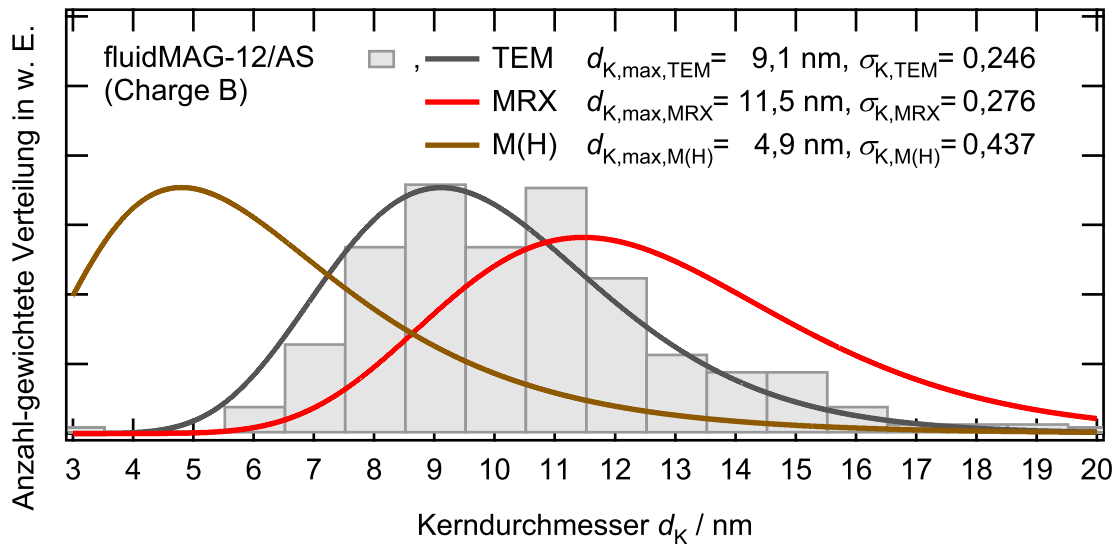


Abb. 4.10 – Vergleich der Kerngrößenverteilungen des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) aus MRX- und Magnetisierungsmessungen mit dem Histogramm aus TEM-Aufnahmen.

wurden. Die relativen Abweichungen der Maxima sind geringer als bei der Kerndurchmesserbestimmung. Die Bestimmung des Kerndurchmessers mit dem MRX-Verfahren liefert trotz angenommener Multikernpartikel im Vergleich zu den TEM-Aufnahmen nur eine geringe Abweichung. Tabelle 4.1 fasst die Charakterisierungsergebnisse zusammen.

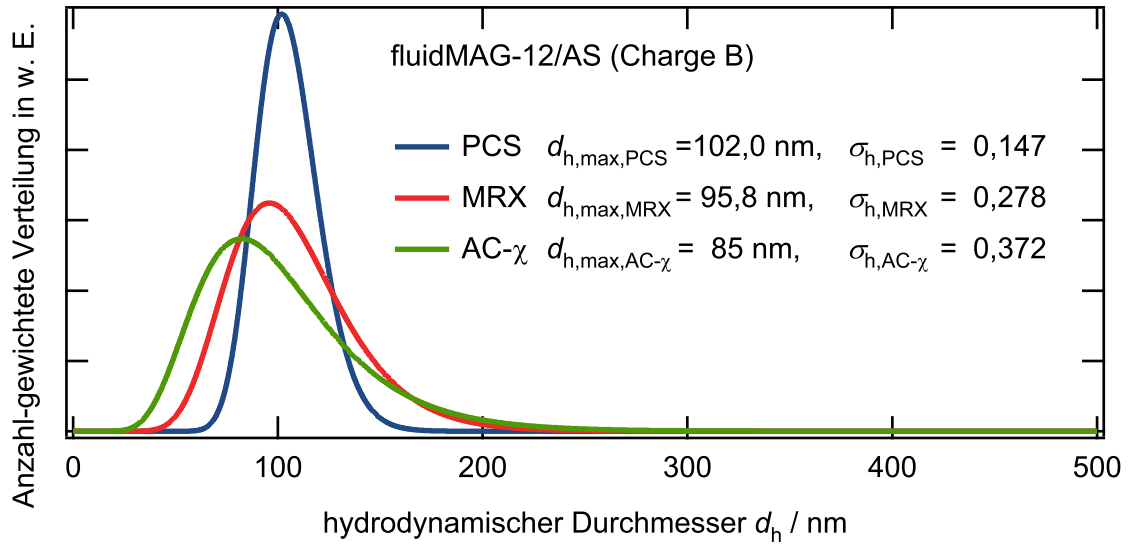


Abb. 4.11 – Vergleich der Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser-Verteilung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) aus MRX-, PCS- und AC-Suszeptibilitätsmessungen.

Tab. 4.1 – Vergleich der Charakterisierungsmethoden für die Kern- und hydrodynamischen Eigenschaften von magnetischen Nanopartikeln.

Methode	$d_{\max,K} / \text{nm}$	σ_K	$K_{\text{eff}} / \text{J/m}^3$	$M_S / \text{kA/m}$	$d_{\max,h} / \text{nm}$	σ_h
MRX	11,5	0,276	8 748	—	95,8	0,278
TEM	9,1	0,246	—	—	—	—
M(H)	4,9	0,437	—	350	—	—
AC- χ	—	—	—	—	85	0,372
PCS	—	—	—	—	102	0,147

4.4 Magnetrelaxometrie für die Herstellung, Qualitätssicherung und Anwendung von Ferrofluiden

In diesem Kapitel wurde gezeigt, wie mit dem Verfahren der Fluxgate-Magnetrelaxometrie die Größenverteilungen der magnetischen Kerne und die Größenverteilung des hydrodynamischen Durchmessers von magnetischen Nanopartikeln quantitativ bestimmt werden können. Zusätzlich kann das Verhältnis der Sättigungsmagnetisierung zur effektiven Anisotropiekonstante mit Messungen des Aufmagnetisierungsvorganges quantitativ bestimmt werden. Vergleicht man die Ergebnisse der Kerndurchmesserbestimmung des MRX-Verfahrens mit den TEM-Aufnahmen, so ist eine gute Übereinstimmung festzustellen. Der Einfluss von Wechselwirkungen der magnetischen Kerne untereinander sollte jedoch bei zu starken Wechselwirkungen berücksichtigt werden und eine Verteilung der Energiebarriere anstelle des Kerndurchmessers angegeben werden. Die Energiebarrierverteilung ist z.B. für das Verfahren der Hyperthermie mit magnetischen Nanopartikeln eine wichtige Information. Die Verfahren zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers lieferten alle vergleichbare Ergebnisse des mittleren hydrodynamischen Durchmessers.

Das MRX-Verfahren ist aufgrund des schnellen Messzyklus für die Qualitätssicherung während der Produktion und kurz vor der Anwendung von magnetischen Nanopartikeln interessant. Neben den quantitativen Charakterisierungen von magnetischen Nanopartikeln können diese auch qualitativ über die Veränderung der Relaxationskurven beurteilt werden. Es kann überprüft werden, ob die Nanopartikel von Produktionscharge zu Produktionscharge unterschiedlich sind, in dem Einsatzmedium agglomerieren oder über einen längeren Zeitraum altern. Diese Informationen können sowohl vom Hersteller der Nanopartikel als auch vom Anwender gemessen und verwendet werden. Beispiele für qualitative Tests von Nanopartikeln werden im nächsten Kapitel ausgeführt.

5

Anwendungen in der Bioanalytik

In diesem Kapitel werden Anwendungen magnetischer Nanopartikel beschrieben, die auf der Untersuchung der Relaxationseigenschaften beruhen. Dazu wird das magnetische Relaxationsverhalten im Zeitbereich gemessen und analysiert. Die präsentierten Anwendungen nutzen die Relaxationseigenschaften der magnetischen Nanopartikel auf unterschiedliche Weise. Sie zeigen die Möglichkeiten des auf Fluxgates basierenden MRX-Systems und stehen stellvertretend für neuartige Einsatzmöglichkeiten von magnetischen Nanopartikeln. Zur Auswertung werden die im Kapitel 1 „Grundlagen“ vorgestellten Analysemethoden angewandt und diskutiert.

Die ursprüngliche Anwendung der Messung des Relaxationsverhaltens magnetischer Nanopartikel ist der Einsatz als Marker in biochemischen Nachweistests. Mit Antikörpern funktionalisierte magnetische Nanopartikel können als Marker in Immunoassays genutzt werden. Gegenüber anderen Markern besitzen sie wesentliche Vorteile. Ihre magnetischen Eigenschaften sind sehr stabil über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis zu einigen Jahren. Biochemische Nachweise können *in vivo* im Blut ohne Auswaschschritte von ungebundenen Markern durchgeführt werden. Zunächst wird der Einfluss der Viskosität der Trägerflüssigkeiten auf das Relaxationsverhalten der magnetischen Nanopartikel untersucht. Um die Einsatzfähigkeit des aufgebauten MRX-Forschungssystems für biochemische Nachweistests zu demonstrieren, sind verschiedene Versuche mit dem Affinitätssystem Streptavidin-Biotin durchgeführt worden. Hierbei wurde die zusätzliche Messunsicherheit betrachtet, die sich aus der Bindung zwischen Ligand und Rezeptor ergibt.

Die abschließende Anwendung verwendet magnetische Nanopartikel nicht als Marker, um Substanzen zu kennzeichnen, sondern als Sonden, deren Beweglichkeit gemessen wird. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurde in einer gemeinsamen Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie und dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig erstmals das magnetische Relaxationsverhalten magnetischer Nanopartikel zur Charakterisierung von Hydrogelen eingesetzt.

5.1 Einfluss der dynamischen Viskosität von Trägerflüssigkeiten

5.1.1 Versuchsbeschreibung

Sind magnetische Nanopartikel in einer Trägerflüssigkeit suspendiert, beeinflusst deren dynamische Viskosität direkt die Brownschen Relaxationszeiten. In der phänomenologischen Beschreibung einer Brown-Relaxation (1.43) und in der physikalischen Beschreibung mit dem magnetischen Cluster-Momenten-Superpositions-Modell (1.38) ist die Brownsche Relaxationszeitkonstante (1.23) proportional zur dynamischen Viskosität der Trägerflüssigkeit. Wird die Viskosität zu groß, relaxieren die magnetischen Nanopartikel nach dem Néel-Mechanismus. Jedes einzelne magnetische Nanopartikel rotiert in der Mikroviskosität seiner direkten Umgebung. Die Brownsche Rotation der magnetischen Nanopartikel wird außer von der thermischen Energie und der dynamischen Viskosität auch von Wechselwirkungen der Partikelhülle mit der umgebenen Trägerflüssigkeit bestimmt. Es können z.B. die Rotationseigenschaften durch unterschiedliche Längen von Hüllenpolymeren eingestellt werden [121].

Die folgenden Messungen mit Trägerflüssigkeiten verschiedener Viskosität zeigen den Einfluss der Viskosität auf die Magnetisierungs- und Relaxationsverläufe magnetischer Nanopartikel. Insbesondere muss bei veränderlicher Viskosität die Analysemethode kritisch betrachtet werden.

5.1.2 Materialien

Zur Untersuchung des viskositätsabhängigen Magnetisierungs- und Relaxationsverhaltens von magnetischen Nanopartikeln wurden Trägerflüssigkeiten unterschiedlicher Viskosität erstellt. Ausgehend von einem 0,949 g/g Glycerin-Wasser-Stammgemisch wurden weitere Gewichtsverhältnisse angesetzt. Die Viskosität des Stammgemisches wurde mit einem Rotationsrheometer RheoStress® RS100 der Firma Haake (Karlsruhe, Deutschland) bei 25 °C gemessen und mit Hilfe der empirischen Formel für Glycerin-Wasser-Gemische nach Cheng [122] zu einem Masseanteil von 0,949 g/g umgerechnet. Die Tabelle 5.1 listet alle erstellten Gemische und deren berechneten und gemessenen dynamischen Viskositäten auf. Zusätzlich wurde Honig als weitere Trägerflüssigkeit verwendet. Honig hat bei Raumtemperatur eine sehr hohe Viskosität von ca. 10000 mPa s, bei der der Wechsel vom Brownschen zum Néelschen Mechanismus demonstriert werden soll. Als Ferrofluid wurde das wässrige fluidMAG-12/AS (Charge C) mit einer Polyacrylsäure-Hülle und einem Feststoffanteil von 75 mg/mL verwendet.

5.1.3 Versuchsdurchführung

In Mikrotitergefäßen wurden zu Vergleichszwecken jeweils zwei Ansätze von 150 µL VE-Wasser bzw. 150 µL mit 0,3 g/g, 0,6 g/g, 0,9 g/g und 0,949 g/g Glycerin-Wasser gegeben. Dazu wurden 1 µL fluidMAG-12/AS pipettiert. Zwei weitere Proben wurden jeweils mit 1 µL fluidMAG-12/AS und 150 µL Honig erstellt. Die Proben wurden mit dem MRX-Forschungssystem mit Standardparametern für flüssige Proben gemessen:

Aufmagnetisierungsfeld $B_{\text{mag}} = 2 \text{ mT}$, Aufmagnetisierungszeit $t_{\text{mag}} = 2 \text{ s}$, Relaxationszeit $t_{\text{rel}} = 1,5 \text{ s}$ und Pause $t_{\text{Pause}} = 2 \text{ s}$. Die Temperatur im Messaufbau betrug $23,3^\circ\text{C}$. Die gemessenen Relaxationskurven bei hohen Viskositäten der Glycerin-Wasser-Gemische mit $0,9 \text{ g/g}$ und $0,949 \text{ g/g}$ zeigten ein erwartetes langes Relaxieren. Die Relaxationskurven waren aber zur Vergleichsprobe unterschiedlich. Die Präparation war bei diesen hohen Viskositäten aufgrund der inhomogenen Mischung nicht zuverlässig und daher werden diese Proben im Folgenden nicht weiter betrachtet. Bei allen anderen Proben war die Relaxationskurve der Vergleichsprobe übereinstimmend.

5.1.4 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 5.1 sind simulierte und gemessene Aufmagnetisierungs- sowie Relaxationskurven gezeigt. Die Simulationen wurden mit dem Cluster-Momenten-Superpositions-Modell (1.38) durchgeführt. Für die magnetischen Nanopartikel wurden folgende physikalischen Eigenschaften angenommen: Sättigungsmagnetisierung $M_{\text{S}} = 480000 \text{ A/m}$, effektive Anisotropiekonstante $K_{\text{eff}} = 7000 \text{ J/m}^3$, logarithmische Normalverteilung der Kerndurchmesser $\mu_{\text{K}} = 2,651$ und $\sigma_{\text{K}} = 0,25$. Des Weiteren wurde eine konstante Hüllendicke von 50 nm angenommen.

Tab. 5.1 – Viskosität von VE-Wasser-Glycerin-Gemischen in unterschiedlicher Gewichtskonzentration bei Temperaturen von 25°C und $23,3^\circ\text{C}$.

	berechnete Viskosität in mPa s	gemessene Viskosität in mPa s
Rotationsrheometer		
Temperatur 25°C		
<i>Ausgangskonzentration</i>		
Glycerin $0,949 \text{ g/g}$		$340,16 \pm 10$
<i>VE-Wasser-Glycerin-Gemische</i>		
Glycerin $0,3 \text{ g/g}$	2,12	$2,58 \pm 0,02$
Glycerin $0,6 \text{ g/g}$	8,85	$11,74 \pm 0,08$
Glycerin $0,8 \text{ g/g}$	45,35	$51,96 \pm 0,66$
Glycerin $0,9 \text{ g/g}$	156,35	$181,85 \pm 0,14$
Magnetrelaxometrie		
Temperatur $23,3^\circ\text{C}$		
Glycerin $0,3 \text{ g/g}$	2,22	$1,84 \pm 0,002$
Glycerin $0,6 \text{ g/g}$	9,49	$8,7 \pm 0,2$
Glycerin $0,8 \text{ g/g}$	49,99	(408 ± 120)
Glycerin $0,9 \text{ g/g}$	179,88	inhomogen
Glycerin $0,945 \text{ g/g}$	397,44	inhomogen

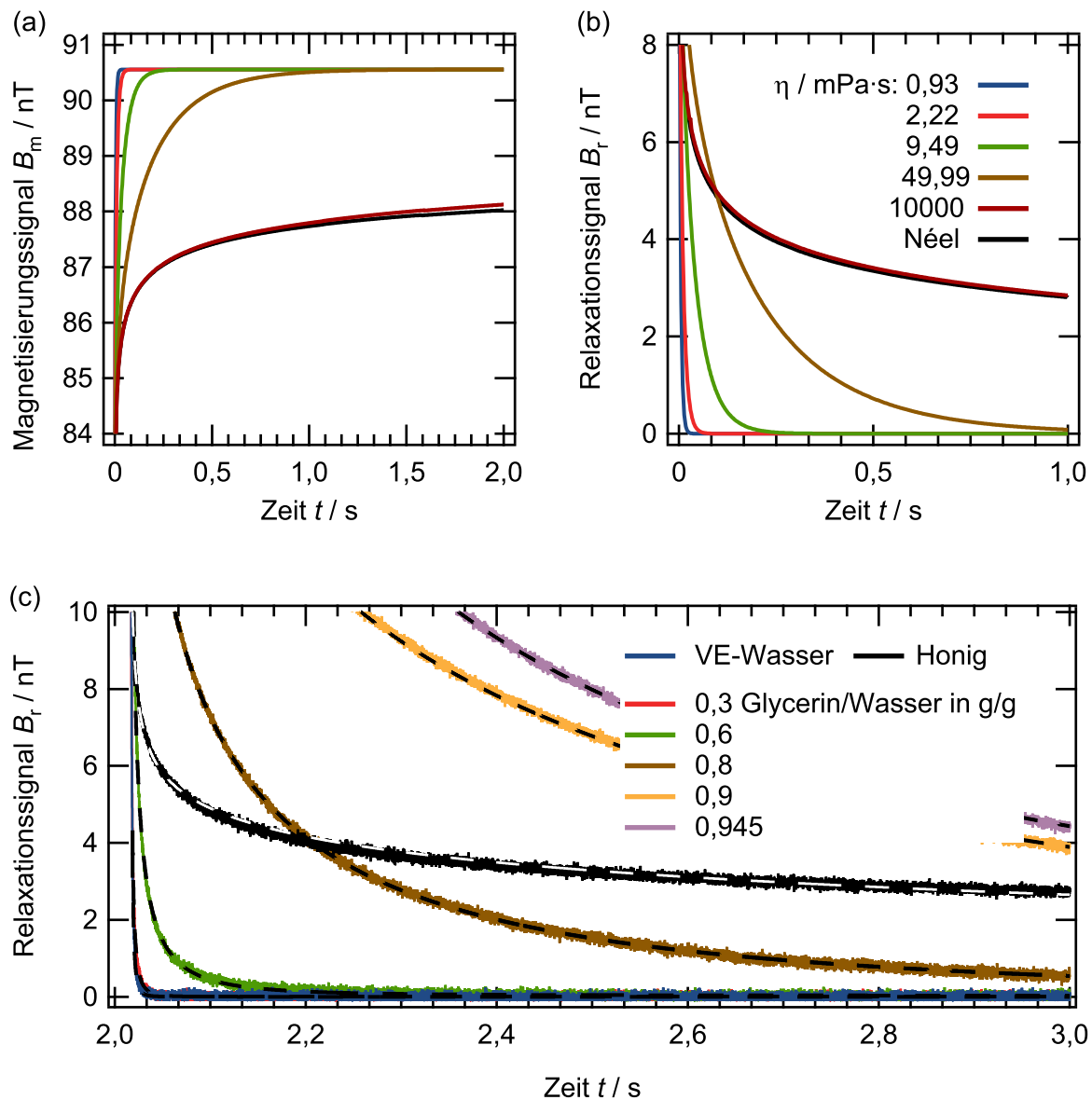


Abb. 5.1 – Einfluss der Viskosität der Trägerflüssigkeit. (a) Simulation der Aufmagnetisierungskurven. (b) Simulation der Relaxationskurven. (c) Relaxationskurven der Versuchsreihe. Gestrichelt sind die mit dem Superpositions-Modell (1.48) angepassten Relaxationskurven eingezeichnet.

Beim Aufmagnetisierungsprozess in Abbildung 5.1(a) ist das verzögerte Magnetisieren mit zunehmender Viskosität zu sehen. Wird das Aufmagnetisierungsfeld nach zwei Sekunden abgeschaltet, relaxieren die magnetischen Nanopartikel je nach Viskosität von einem anderen Aufmagnetisierungs-Niveau. In Abbildung 5.1(b) äußert sich dies durch das Überkreuzen der Relaxationskurven der immobilisierten Néel-Relaxation mit der mobilen Brown-Relaxation bei Viskositäten über 50 mPa·s. Qualitativ wurden die gleichen Ergebnisse im Experiment in der Abbildung 5.1(c) gewonnen. Bei der Honig-Probe hat sich der Relaxationsverlauf völlig verändert. Die Nanopartikel sind

in der hohen Viskosität derart unbeweglich, dass nicht mehr die Brown-Relaxation dominiert, sondern die Néel-Relaxation. Daher folgt die Relaxation im Vergleich zu den Glycerin-Proben einem qualitativ anderen Verlauf (Abbildung 5.1(c)). Da das phänomenologische Modell der gestreckten Exponentialfunktion den Aufmagnetisierungsprozess nicht berücksichtigt, ergeben sich in der Kurvenanpassung mit diesem unterschiedliche Amplituden $B_{0,B}$. Die Amplitude $B_{0,B}$ ist im Fall eines Experimentes bei dem sich die Viskosität der Trägerflüssigkeit stark verändert, kein Maß mehr für den Anteil von ungebundenen Nanopartikeln. Die Kurvenanpassungsparameter der gestreckten Exponentialfunktion sind in Abbildung 5.2 für verschiedene Viskositäten aufgetragen. Die Amplituden $B_{0,B}$ und die Zeitkonstanten τ_B nehmen mit wachsender Viskosität zu – wie zu erwarten war. Der für das Ferrofluid charakteristische Parameter β ändert sich ebenfalls mit der Viskosität und muss daher für jede Viskosität neu bestimmt werden.

Inwieweit bei Änderung der Viskosität die phänomenologische Superposition (1.48) noch angewendet werden kann, muss überprüft werden. Da sich die Parameter $B_{0,B}$, τ_B und β der mobilen Nanopartikel mit der Viskosität ändern, können sie nicht mehr mit einer Referenzprobe ermittelt werden. Sie müssen bei einer Kurvenanpassung veränderbar bleiben. Es können nur die Parameter $B_{0,N}$, τ_N mit einer immobilisierten Referenzprobe bestimmt werden. Die Unsicherheit der Bestimmung des Anteils von immobilisierten Nanopartikeln wurde in Kapitel 3.4.2 “Einfluss der mathematischen Auswertung” diskutiert.

In Abbildung 5.1(c) sind gestrichelt die Kurvenanpassungen mit der phänomenologischen Superposition gezeigt. Der Offset B_{Offset} wurde vor der Anwendung von (1.48) korrigiert. Die Auswertung ergab für Viskositäten bis 340 mPas keinen Anteil an immobilisierten Nanopartikeln. Zur Bestimmung der Viskositäten mit dem Cluster-MSM wurden die Kernparameter für eine immobilisierte Referenzprobe mit dem MSM bestimmt. Danach wurde mit diesen Parametern die Größenverteilung der Hülle bei einer Viskosität von VE-Wasser mit dem Cluster-MSM bestimmt. Zur Bestimmung der Viskositäten der höher viskosen Trägerflüssigkeiten wurde nur der Parameter Viskosität zur

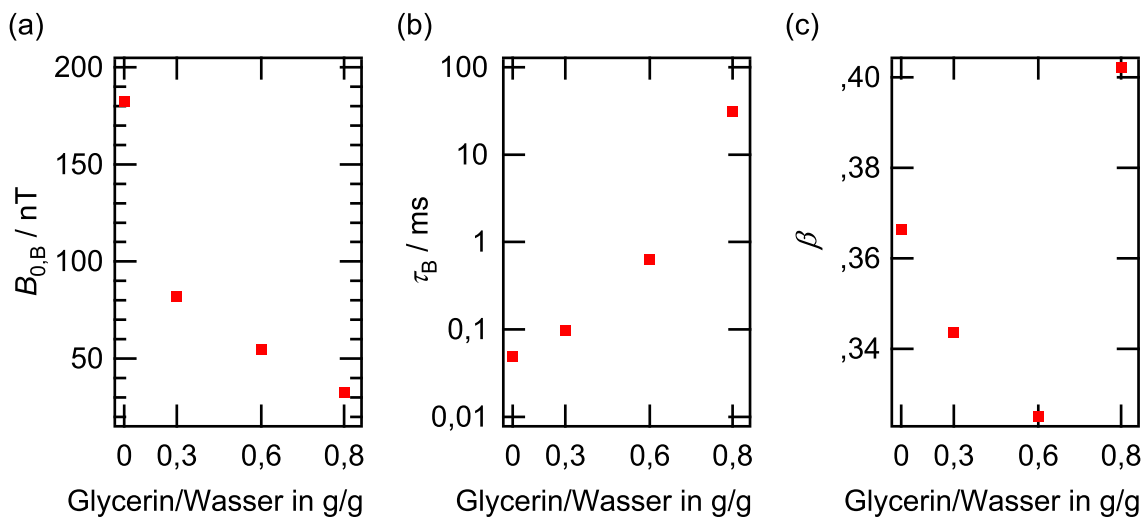


Abb. 5.2 – Kurvenanpassungsparameter der gestreckten Exponentialfunktion.

(a) Amplitude $B_{0,B}$. (b) Zeitkonstanten τ_B . (c) Parameter β .

Kurvenanpassung zugelassen. Bis zu einer Viskosität von 10 mPa s konnte die Viskosität bestimmt werden. Für höhere Viskositäten war diese Bestimmung nicht erfolgreich. Ein Grund dafür könnte das geringe Signal der VE-Wasser-Referenzprobe sein.

5.2 Das Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem

Avidin (vom Hühnereiweiß) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 66000 Dalton. Es besitzt vier nahezu identische Untereinheiten, die je ein Biotin-Molekül mit sehr hoher Spezifität und Affinität binden können. Es ist die stärkste bekannte nicht kovalente Bindung mit einer sehr geringen Dissoziationskonstante von 10^{-15} mol/L [123]. Im Vergleich hierzu haben Antikörper-Antigen-Bindungen Dissoziationskonstanten von 10^{-4} mol/L bis 10^{-10} mol/L [124]. Die Bindung ist in weiten Bereichen gegenüber Änderungen von Temperatur und pH-Wert stabil. Mit einem sehr geringen Molekulargewicht von 244 Dalton lässt sich Biotin an andere Biomoleküle binden, ohne deren Eigenschaften zu verändern. Hierzu existiert eine Vielzahl von Möglichkeiten, Biomoleküle zu biotinylieren [125]. Das (Strept)Avidin-Biotin-Affinitätssystem wird seit vielen Jahren in verschiedensten Anwendungen eingesetzt, z.B. in der Cytochemie [126], Immunologie [127], Bioanalytik [128] und zur Separation [129]. Neue Anwendungen verwirklichen Nanostrukturen mit dem (Strept)Avidin-Biotin-System [130, 131]. Für die Anwendung ist Streptavidin interessant, da es auf Grund des fehlenden Zuckers weniger unspezifische Bindungen als Avidin eingeht [132]. Streptavidin wird industriell durch das Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert.

Magnetische Nanopartikel mit einer Streptavidin-Funktionalisierung können von verschiedenen Herstellern bezogen werden. Mit diesen lassen sich, z.B. mit biotinylierten Antikörpern, Marker für ein Immunoassay herstellen. In dieser Arbeit wird das Streptavidin-Biotin-System als Modellsystem benutzt, um mit dem neu aufgebauten Fluxgate-MRX-System biochemische Bindungsnachweise durchzuführen. Mit Streptavidin-funktionalisierte magnetische Nanopartikel werden an unterschiedlich große biotinylierte Analyte gebunden. Je nach Größe des Analyten muss die Auswertung der Bindung unterschiedlich durchgeführt werden.

5.3 Immobilisierung Streptavidin-funktionalisierter magnetischer Nanopartikel an biotinylierten Agarose-Beads

5.3.1 Versuchsbeschreibung

In diesem Versuch wird die Bindung Streptavidin-funktionalisierter superparamagnetischer Nanopartikel an biotinylierten Agarose-Beads untersucht und quantifiziert. Der Anteil gebundener Nanopartikel wird dabei in Anwesenheit der ungebundenen Nanopartikel gemessen. Dies entspricht einem homogenen Nachweistest (Assay).

In Abbildung 5.3 ist der Bindungsvorgang schematisch dargestellt. Die Bindungspartner sind in einem flüssigen Medium (PBS-Puffer) suspendiert. Die magnetischen Nanopartikel haben einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm, während die Agarose-Beads einen mittleren Durchmesser größer 5 μm besitzen. Bindet ein Nanopartikel an ein Biotin-Agarose-Bead, wechselt seine Relaxationsart vom Brownschen zum Néelschen Mechanismus. Die Brownsche Rotation des Bindungskomplexes ist aufgrund des Durchmessers (größer 5 μm) langsamer als die Drehung des Magnetisierungsvektors innerhalb des Nanopartikels. Das Nanopartikel ist am Agarose-Bead immobilisiert.

Die Bindungsart entspricht dem präparierten Kopplungsexperiment aus Kapitel 3.4.3 und kann mit der phänomenologischen Superposition (1.48) von Modellfunktionen quantitativ ausgewertet werden (Kapitel 1.6.2). Hierzu wurden ungebundene und immobilisierte Referenzproben präpariert und vermessen.

Im ersten Teil wird die Bindungskinetik der Partner mit dem MRX-Forschungssystem bestimmt. Aufgrund des großen hydrodynamischen Durchmessers der Bindungspartner wird die Bindungskinetik von deren Diffusionsgeschwindigkeit begrenzt sein. Die Kennt-

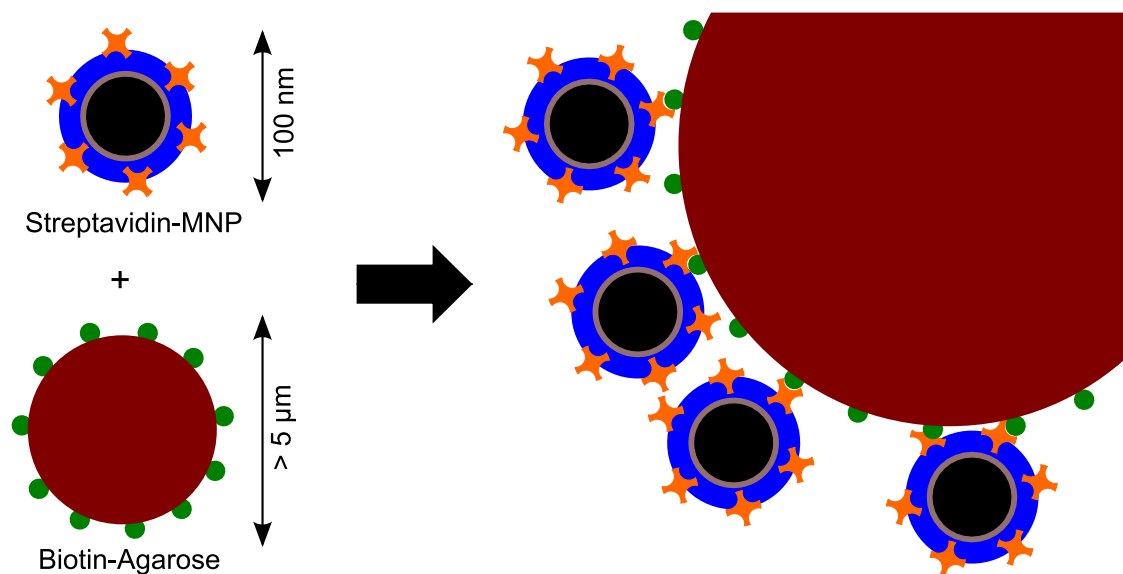


Abb. 5.3 – Skizze der Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln und biotinylierten Agarose-Beads.

nis des Gleichgewichtszustands aus der Bindungskinetik ist für den späteren Bindungsnachweis wichtig. Um unspezifische Bindungen an die Biotin-Agarose auszuschließen, wurde mit unterschiedlichen unfunktionalisierten magnetischen Nanopartikeln getestet, ob diese an die Biotin-Agarose binden. Die Spezifität der Streptavidin-Biotin-Bindung wurde in Kontrollversuchen mit Biotin-geblockten, Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln nachgewiesen. Mit den Versuchen wird gezeigt, dass die Spezifität zwischen Streptavidin und Biotin für die Bindung verantwortlich ist.

Im zweiten Teil des Bindungsversuchs wird eine Konzentrationsreihe mit steigendem Biotin-Agarose-Bead- und konstantem Nanopartikel-Gehalt präpariert. Hiermit wird die Bindungsfähigkeit der Nanopartikel ermittelt und die Linearität der Methode gezeigt.

Abschließend wird die Messunsicherheit des Messverfahrens und die Reproduzierbarkeit des Bindungsnachweises mit dem Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem untersucht.

5.3.2 Materialien

Streptavidin-funktionalisierte superparamagnetische Nanopartikel und nicht funktionalisierte magnetische Nanopartikel wurden von der Firma chemicell GmbH bereitgestellt. Die Biotin-Agarose, Biotin und der PBS-Puffer wurden von der Firma Sigma-Aldrich beschafft. Für die Versuche wurden Substanzen gleicher Chargen verwendet.

Weitere Informationen und benutzte Laborgeräte sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

5.3.3 Bindungskinetik

Versuchsdurchführung

Bevor die in PBS-Puffer gelieferten Biotin-Agarose-Beads eingesetzt werden konnten, wurden sie mit PBS-Puffer 3-mal gewaschen. Dies stellt sicher, dass sich kein gelöstes Biotin im ursprünglichen PBS-Puffer befindet. Das gelöste Biotin könnte die Bindungsplätze der superparamagnetischen Nanopartikel besetzen und weitere Bindungen an die Biotin-Agarose-Beads verhindern. Um die Biotin-Agarose-Beads besser pipettieren zu können, wurden sie um den Faktor zwei mit PBS-Puffer verdünnt. Die Mengenangaben der Biotin-Agarose-Beads beziehen sich auf den unverdünnten Gehalt der Stammlösung. Direkt vor der MRX-Messung wurden 10 μL fluidMAG-BC/Streptavidin zu 22,5 μL Biotin-Agarose und 95 μL PBS-Puffer pipettiert und das Probengefäß per Hand geschüttelt. Die erste MRX-Messung startete 10 Sekunden nach dem Mischen. Die Proben wurden mit dem MRX-Forschungssystem mit 5 Wiederholzyklen bei den Standardparametern für flüssige Proben gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Mit einer ungebundenen und mehreren immobilisierten Referenzproben und dem phänomenologischen Superpositions-Modell (1.48) wurden die Relaxationskurven quantitativ ausgewertet.

Abbildung 5.4 zeigt den Anteil der gebundenen superparamagnetischen Nanopartikel über die Bindungszeit. Der erste Messpunkt beginnt bei 40 Sekunden nach dem Mischen. Nach dieser Zeit sind etwa 20 % der Nanopartikel gebunden. Da die Biotin-Agarose leicht sedimentiert, wurde die Probe vor jedem Messpunkt per Hand geschüttelt. Die

Tab. 5.2 – Materialien und Laborgeräte für den Bindungsnachweis zwischen Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln und Biotin-Agarose.

	Firma, Sitz, Produkt-Nr.
Magnetit-Nanopartikel	
Hülle: Stärke	chemicell GmbH, Berlin
Funktionalisierung: Streptavidin	fluidMAG-BC/Streptavidin
	10 mg/mL Feststoffanteil
	6,27 mg/mL Eisen
Hülle Polyacrylsäure	fluidMAG-12/AS
Hülle Gummi Arabicum	fluidMAG-GA/GV
Hülle Stärke	fluidMAG-D
Hülle Stärke	fluidMAG-D/5E
Hülle Citrat	fluidMAG-Citrat
Substanzen, Puffer	
Biotin-Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Produkt-Nr. B0519
	4 µL Biotin pro mL Gel
Biotin	Produkt-Nr. B4501
PBS-Puffer	Produkt-Nr. P4244
Probengefäße	
Break-Apart Vials Polysorb	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Geräte	
	Eppendorf, Hamburg
Volumenpipette	
Thermomixer comfort	mit Einsatz für 1,5 mL Reaktionsgefäße
	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Biofuge 13

Relaxationskurven der 5 Wiederholmessungen einer Mittelung unterscheiden sich nicht voneinander. Während der Magnetisierung ändert sich das Streufeld jedoch stetig aufgrund der Sedimentation der Biotin-Agarose-Beads. Dies ist durch das größere Streufeld der ausgerichteten superparamagnetischen Nanopartikel während der Magnetisierung zu erklären.

Der Verlauf zeigt eine Kinetik 1. Ordnung mit einer Zeitkonstanten von 10 Minuten (gestrichelte Kurve). Erst nach 2 Stunden sind ca. 95 % der superparamagnetischen Nanopartikel an die Biotin-Agarose-Beads gebunden. Der begrenzende Bindungsvorgang

ist die langsame Diffusionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner und die abnehmende Anzahl an Bindungsstellen. Des Weiteren sind die sedimentierten Biotin-Agarose-Beads sterisch schlechter von dem superparamagnetischen Nanopartikel zu erreichen. Für einen Bindungsnachweis bedeutet dies, dass der Anteil der gebundenen Nanopartikel nach 2 Stunden Inkubation im Gleichgewichtszustand gemessen werden kann.

Messunsicherheit

Die empirische Ermittlung der Messunsicherheit wird im nächsten Versuchsteil ausführlich behandelt. Die Fehlerbalken in Abbildung 5.4 sind empirisch ermittelt worden und betragen bindungsunabhängig $\pm 3\%$.

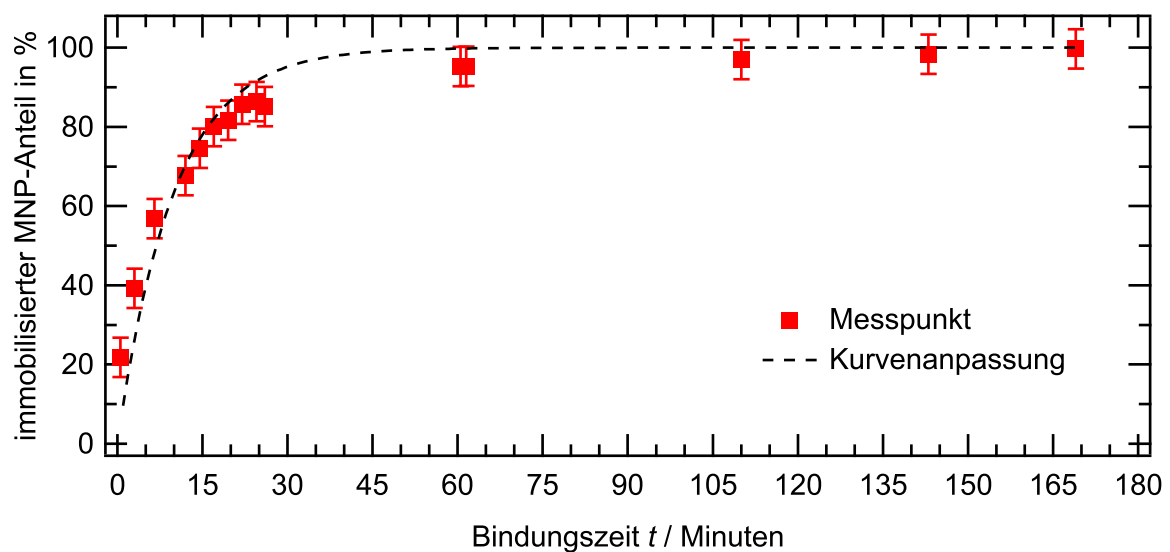


Abb. 5.4 – Bindungskinetik von Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln und biotinylierter Agarose-Beads über einen Zeitbereich von 1 bis 170 Min., Fehlerbalken: Standardunsicherheit $k = 1$.

5.3.4 Bindungsfähigkeit

Versuchsdurchführung

Mit gewaschenen Biotin-Agarose-Beads wurde eine Konzentrationsreihe zum Test der Bindungsfähigkeit der magnetischen Nanopartikel und zur Demonstration der Linearität des Verfahrens präpariert. Die Biotin-Agarose-Bead-Menge wurde von 0 μL bis zu 32,5 μL variiert. Es wurden jeweils 10 μL fluidMAG-BC/Streptavidin verwendet und mit PBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 μL aufgefüllt. Die Proben wurden dann 2 Stunden in dem Thermomixer bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die Proben alle 2,5 Minuten 5 Sekunden lang mit 1400 rpm geschüttelt. Hierdurch werden die sedimentierten Biotin-Agarose-Beads vollständig aufgewirbelt. Dieses Vorgehen gewährleistet eine nahezu vollständige Bindung, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt.

Zusätzlich wurden die Biotin-Agarose-Beads mit Hilfe von Ferrofluiden unterschiedlicher Hülleneigenschaften auf unspezifische Bindungen getestet.

Die Spezifität der Streptavidin-Biotin-Bindung wurde mit Biotin-geblockten fluidMAG-BC/Streptavidin-Nanopartikeln überprüft. Dabei wurde die Menge an freiem Biotin zum Blocken der Nanopartikel variiert.

Alle Proben wurden direkt nach dem Schütteln mit dem MRX-Forschungssystem mit 5 Wiederholzyklen bei den Standardparametern für flüssige Proben gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Mit einer ungebundenen und mehreren immobilisierten Referenzproben und dem phänomenologischen Superpositions-Modell (1.48) wurden die Relaxationskurven quantitativ ausgewertet. In Abbildung 5.5 sind die Anteile immobilisierter superparamagnetischer Nanopartikel der Biotin-Agarose-Bead-Verdünnungsreihe und von zwei Kontrollreihen gegen die Biotin-Agarose-Bead-Menge aufgetragen. Die mit Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikel zeigen einen linear zunehmenden Anteil immobilisierter Nanopartikel bei Biotin-Agarose-Bead-Mengen zwischen 2,5 μL und 27,5 μL . Dieses entspricht dem linearen Arbeitsbereich bei einer Menge an Nanopartikeln von 10 μL und ist vergleichbar mit dem linearen Arbeitsbereich aus Abschnitt 3.4 der Kalibrierproben. Oberhalb von 27,5 μL Biotin-Agarose-Beads sättigt das Signal, da alle Nanopartikel gebunden sind.

Des Weiteren sind zwei Konzentrationsreihen mit Biotin-geblockten fluidMAG-BC/Streptavidin Nanopartikeln dargestellt. Die Nanopartikel wurden mit dem Thermomixer bei Raumtemperatur mit unterschiedlicher Biotin-Konzentration geblockt und danach 20 Stunden mit den Biotin-Agarose-Beads in dem Thermomixer inkubiert. Erst bei einem extremen, 10000-fachen Überschuss an Biotin (8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) im Vergleich zu den Streptavidin-Bindungsstellen der Nanopartikel sind diese vollständig geblockt, so dass keine Bindung mehr nachweisbar war. Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse der unspezifischen Bindung der Biotin-Agarose-Beads. Das vollständig geblockte fluidMAG-BC/Streptavidin zeigte keine Bindung mehr bis zu einem Biotin-Agarose-Bead-Gehalt von 27,5 μL .

Alle anderen Ferrofluide wurden mit 20 μL Biotin-Agarose-Beads getestet. Die Menge der Nanopartikel war vergleichbar mit der von 10 μL fluidMAG-BC/Streptavidin. Nur die magnetischen Nanopartikel fluidMAG-12/AS und fluidMAG-Citrat mit einer elektronegativen Hülle zeigten leichte Änderungen im Relaxationssignal, die aufgrund

der geringen Änderungen nicht quantitativ auswertbar waren. Die Angaben in Tabelle 5.3 sind daher Schätzwerte. Alle anderen zeigten keine Bindung an die Biotin-Agarose-Beads. Die Versuche haben gezeigt, dass die fluidMAG-BC/Streptavidin-Nanopartikel und die Biotin-Agarose-Beads spezifisch und fast vollständig in der Bindungszeit von zwei Stunden binden.

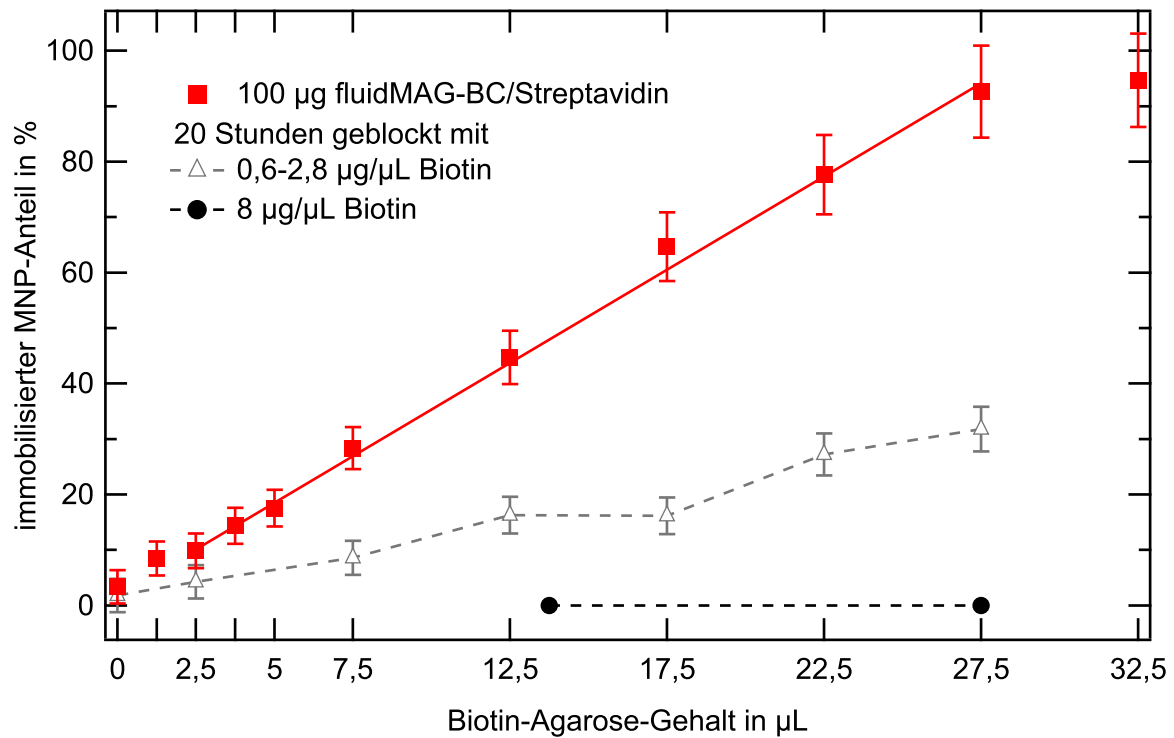


Abb. 5.5 – Anteil der an biotinylierten Agarose-Beads immobilisierten superparamagnetischen Nanopartikel in Abhängigkeit von der Agarose-Bead-Menge und Bindungszeit. Kontrollversuche mit unterschiedlich geblockten Nanopartikeln. $k = 1$.

Tab. 5.3 – Unspezifische Bindung mit Biotin-Agarose.

Ferrofluid	Hülle	unspezifische Bindung
fluidMAG-BC/Streptavidin	Streptavidin: Bindungsplätze geblockt mit 10000-fachem Überschuss an Biotin	keine
fluidMAG-GA/GV	Gummi Arabicum	keine
fluidMAG-D	Stärke	keine
fluidMAG-D/5E	Stärke	keine
fluidMAG-12/AS	Polyacrylsäure	<4 %
fluidMAG-Citrat	Citrat	<1 %

Messunsicherheit

Zur empirischen Messunsicherheitsbestimmung wurden bei drei unterschiedlichen Gehalten an Biotin-Agarose-Beads mit gleicher Menge an Nanopartikeln jeweils bis zu 9 Proben wie bei der ersten Konzentrationsreihe präpariert, gemessen und ausgewertet. Der Gehalt an Biotin-Agarose-Beads wurde in einem Bereich von 5 μL bis 22,5 μL gewählt, bei dem der Arbeitsbereich linear ist. Die Bindungsproben einer Konzentration wurden innerhalb von 15 Minuten gemessen. Wegen der kurzen Messzeit können Messunsicherheiten aufgrund der Umgebungstemperatur und weiterer Bindungsreaktionen vernachlässigt werden. Signifikante Messunsicherheiten sind Pipettierunsicherheiten, Inhomogenitäten der Probe und die Inkubationsbedingungen. Während sich die superparamagnetischen Nanopartikel beim Aliquotieren rückstandslos aus der Pipettenspitze entfernen ließen, verblieb immer ein geringer Teil von Biotin-Agarose-Beads in der Pipettenspitze.

Um die Unsicherheiten der Inkubation und Pipettierung von der Probeninhomogenität und der Messgeräteunsicherheit zu trennen, wurde jeweils eine Probe eines Biotin-Agarose-Bead-Gehalts 6-mal gemessen. Um Pipettierfehler zu isolieren, wurden jeweils die 9 Proben der drei Gehalte an Biotin-Agarose-Beads gemessen. In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse mit t-Faktor gewichteten Standardabweichungen und Variationskoeffizienten zusammengefasst.

Der Anteil an gebundenen Nanopartikeln wurde mit dem Mittelwert aller immobilisierten Referenzproben berechnet. Um nur den Einfluß der Probe zu beurteilen, wurde die Standardabweichung des Mittelwerts der Referenzproben nicht für eine Fehlerfortpflanzung verwendet. Die Homogenität der Varianzen ist über den Gehalt an Biotin-Agarose-Beads gegeben. Deutlich ist die kleinere Standardabweichung bei Wie-

Tab. 5.4 – Präzision unter Wiederholbedingungen und von Probe zu Probe gebundener superparamagnetischer Nanopartikel an Biotin-Agarose-Beads.

Art	Biotin-Agarose-Beads in μL	N	gebundener MNP-Anteil in %	Variationskoeffizient V_k / %
Probe zu Probe	5	9	$24,3 \pm 3,1$	12,7
Wiederholung	5	6	$26,0 \pm 2,1$	8,1
alle	5	15	$24,9 \pm 2,7$	10,8
Probe zu Probe	12,5	9	$56,6 \pm 2,7$	4,7
Wiederholung	12,5	6	$54,4 \pm 1,6$	2,8
alle	12,5	15	$55,7 \pm 2,4$	4,3
Probe zu Probe	22,5	7	$89,0 \pm 4,2$	4,8
Wiederholung	22,5	6	$86,3 \pm 1,4$	1,7
alle	22,5	13	$87,7 \pm 3,3$	3,8

derholmessung einer Probe im Vergleich zur Messungen mehrerer identisch präparierter Proben zu erkennen. Dieser Unterschied ist auf die Unsicherheit der Inkubationsbedingungen und der Probenpräparation zurückzuführen.

Unsicherheitsfortpflanzung

Zur Berechnung des Anteils A gebundener Nanopartikel in Prozent wird die Amplitude der phänomenologischen logarithmischen Funktion der Probe B_{gebunden} auf den Mittelwert der gebundenen Néel-Referenzproben $B_{\text{ref,gebunden}}$ bezogen:

$$A = \frac{B_{\text{gebunden}}}{B_{\text{ref,gebunden}}} \cdot 100. \quad (5.1)$$

Damit ergibt sich für die kombinierte Standardunsicherheit:

$$s^2 = \sqrt{\left(\frac{100}{B_{\text{ref,gebunden}}}\right)^2 \cdot \Delta B_{\text{gebunden}}^2 + \left(\frac{-B_{\text{gebunden}}}{B_{\text{ln,Néel-Referenz}}^2} \cdot 100\right)^2 \cdot \Delta B_{\text{ref,gebunden}}^2}. \quad (5.2)$$

Für die Néel-Referenz wurden sowohl 10 Bindungsproben als auch die Brown-Referenz in einer D-Mannit-Matrix gefriergetrocknet und danach gemessen. Drei Proben wurden 4-mal um jeweils 90 Grad gedreht gemessen, um eine eventuelle Inhomogenität durch die Gefriertrocknung zu berücksichtigen. Die restlichen 8 Proben wurden jeweils einmal gemessen. Für die gemittelte Amplitude $B_{\text{ref,gebunden}}$ ergibt sich eine Standardabweichung von 8,3 %. In ihr sind Pipettierunsicherheiten, Probeninhomogenitäten und Messwiederholunsicherheiten enthalten. Für die Proben wurde eine konzentrationsunabhängige Standardabweichung von 3 % aus den Erfahrungen der Wiederholmessungen angenommen. Mit der Unsicherheitsfortpflanzung (5.2) sind die Fehlerbalken in Abbildung 5.5 berechnet worden. Durch die Unsicherheit der Néel-Referenz werden die Fehlerbalken zu hohen Konzentrationen größer. Dies entspricht einer Unsicherheit der Steigung in der linearen Abhängigkeit zwischen Gehalt an Biotin-Agarose-Beads und berechnetem Anteil. Die Fehlerbalken werden von der Unsicherheit der Néel-Referenz dominiert und können z.B. durch homogenere Néel-Referenzproben oder mehr Wiederholmessungen verbessert werden.

5.4 Quervernetzung Streptavidin-funktionalisierter magnetischer Nanopartikel mit biotinyliertem BSA

5.4.1 Versuchsbeschreibung

In diesem Versuch wird die Quervernetzung von Streptavidin-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln mit dem biotinylierten Serum-Protein BSA (Biotin-BSA) untersucht. Dies lässt sich in einem Nachweistest nutzen. In den immunochemischen Verfahren der Nephelo- und Turbidimetrie wird die Bildung von Antigen-Antikörper-Netzwerken genutzt, um die Konzentration über die Quervernetzung optisch zu messen. Mit der Magnetrelaxometrie kann die Quervernetzung homogen ohne Auswaschen der unvernetzten Nanopartikel gemessen werden. Die Quervernetzung ist schematisch in Abbildung 5.6 gezeigt. Die Bindungspartner sind in einem flüssigen Medium (PBS-Puffer) dispergiert. Die magnetischen Nanopartikel haben einen mittleren Durchmesser von 100 nm, während der Durchmesser des Biotin-BSA mit 6 nm kleiner ist. Der Analyt ist in diesem Fall sehr viel kleiner als im letzten Abschnitt die Agarose-Beads. Beide Reaktionspartner haben mehrere Bindungsstellen. Mit der Zeit werden sich immer größere Cluster bilden. Dies hat zur Folge, dass sowohl der Brown- als auch der Néel-Mechanismus zum Relaxationsverhalten beitragen. Eine quantitative Auswertung der Clustergrößen ist mit dem Cluster-MSM (Kapitel 1.3.2) möglich. Der Grad der Quervernetzung ist nicht nur zeitabhängig, sondern auch konzentrationsabhängig. Ist zu wenig Biotin-BSA vorhanden, können nicht alle Nanopartikel vernetzt werden. Ist zu viel Biotin-BSA vorhanden, werden alle Bindungsplätze der Nanopartikel belegt, so dass keine Vernetzung stattfindet. Beide Situationen werden mit einer Biotin-BSA-Konzentrationsreihe überprüft. Ein Kontrollversuch mit Biotin geblockten magnetischen

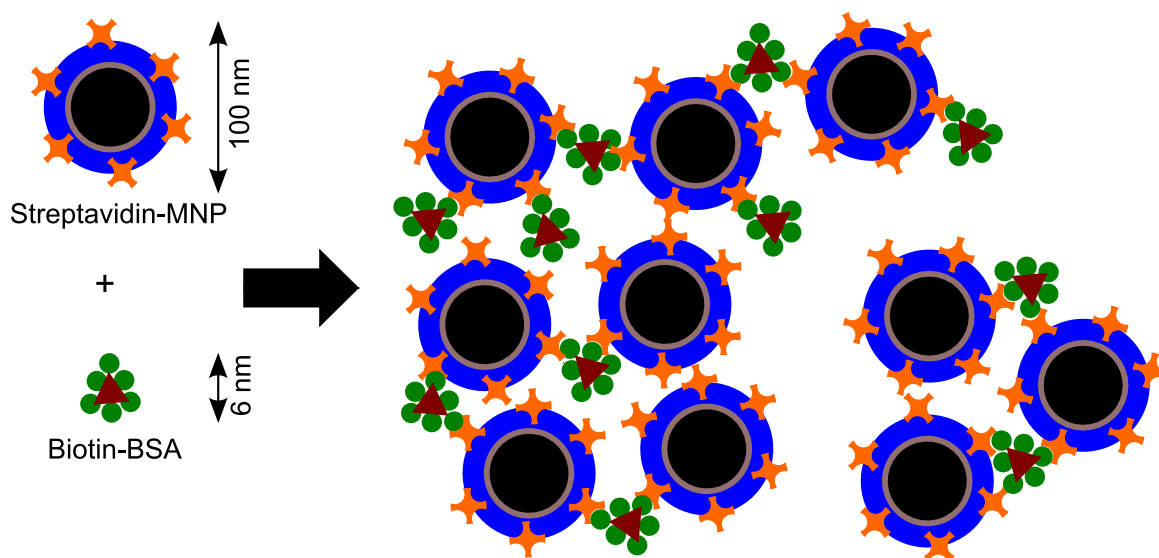


Abb. 5.6 – Skizze der Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln und biotinyliertem BSA.

Nanopartikeln zeigt die Spezifität der Reaktion. Die Reaktionskinetik wird mit verschiedenen Konzentrationen an magnetischen Nanopartikeln bei maximaler Vernetzung analysiert.

5.4.2 Materialien

Streptavidin-funktionalisierte magnetische Nanopartikel und nicht funktionalisierte magnetische Nanopartikel wurden von der Firma chemicell GmbH bezogen. Das Biotin-BSA, Biotin und der PBS-Puffer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Weitere Details und benutzte Laborgeräte sind in Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tab. 5.5 – Materialien und Laborgeräte für die Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln und Biotin-BSA.

	Firma, Sitz, Produkt-Nr.
Magnetit-Nanopartikel	
Hülle: Stärke	chemicell GmbH, Berlin
Funktionalisierung: Streptavidin	fluidMAG-BC/Streptavidin
	10 mg/mL Feststoffanteil
	6,27 mg/mL Eisen
Substanzen, Puffer	
Biotin-BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biotin	Produkt-Nr. A8549
PBS-Puffer	Produkt-Nr. B4501
	Produkt-Nr. P4244
Probengefäße	
Break-Apart Vials Polysorb	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Geräte	
Volumenpipette	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	mit Einsatz für 1,5 mL Reaktionsgefäße
Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Biofuge 13

5.4.3 Vernetzungsfähigkeit

Versuchsdurchführung

Zur Bestimmung der Vernetzungsfähigkeit wurde eine Konzentrationsreihe mit unterschiedlichem Gehalt an BSA-Biotin von 14 $\mu\text{mol/L}$ bis 71,3 $\mu\text{mol/L}$ und 10 μL fluidMAG-BC/Streptavidin präpariert. Das Gesamtvolumen der Proben wurde mit PBS-Puffer auf 150 μL aufgefüllt. Die Proben wurden 8 Stunden bei 20 °C inkubiert und danach mit dem MRX-Forschungssystem gemessen. Direkt nach dem Schütteln wurden die Proben mit dem MRX-Forschungssystem mit 5 Wiederholzyklen der Standardparameter für flüssige Proben gemessen.

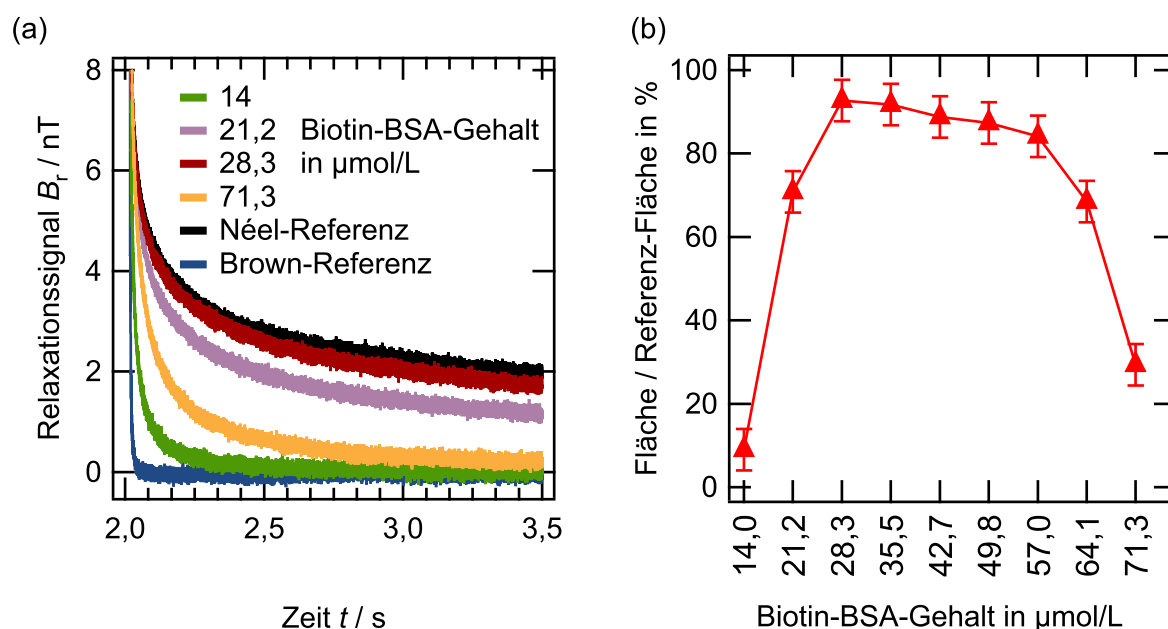


Abb. 5.7 – (a) Relaxationskurven ausgewählter Proben und der Referenzproben. (b) Kompetitive Entwicklung der Clustergröße und Anteil immobilisierter Nanopartikel in Abhängigkeit der Biotin-BSA Konzentration. $k = 1$.

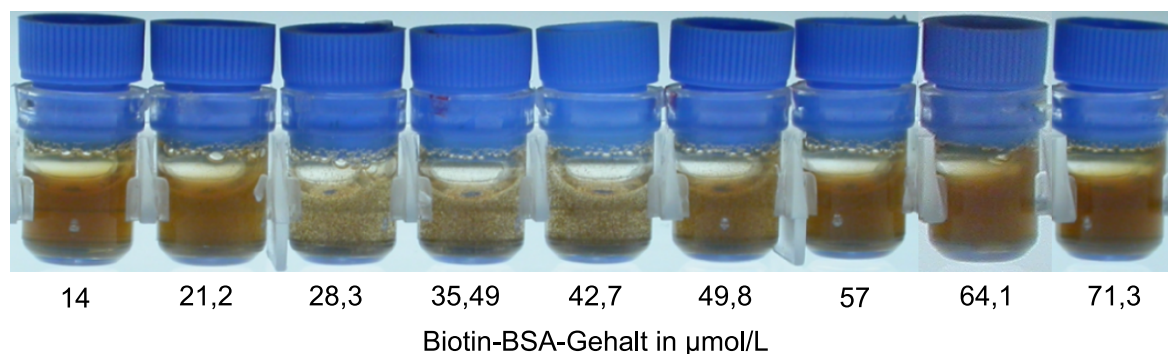


Abb. 5.8 – Fotografie der Proben zur visuellen Demonstration der Vernetzung.

Auswertung und Diskussion

Abbildung 5.7(a) zeigt die Relaxationskurven der ersten Proben bis zum Maximum der Vernetzung und die Probe mit dem höchsten Biotin-BSA-Gehalt. Höhere Konzentrationen an Biotin-BSA verringern die Vernetzung. Zum Vergleich sind die mobilen und immobilisierten Referenzkurven gezeigt. Zur Auswertung zeigt Abbildung 5.7(b) die Fläche unter den Relaxationskurven bezogen auf die Fläche unter der Kurve der immobilisierten Referenzprobe. Dies ist vorerst ein qualitatives Maß für die Vernetzung. Der Verlauf entspricht der Kurve nach Heidelberger und Kendall [133]. Bei Markerüberschuss bilden sich mit zunehmender Analytkonzentration größere Cluster. Im Äquivalenzbereich der Bindungsstellen ist die größte Clustergröße erreicht. Nimmt die Analytkonzentration weiter zu, verkleinert sich die Clustergröße wieder. Das Maximum der Vernetzung ist bei 28,33 $\mu\text{mol/L}$ Biotin-BSA zu erkennen. Die Fotografie 5.8 zeigt die Proben der Vernetzungsreihe. Optisch ist das Ausflocken um die Konzentration der maximalen Vernetzung zu sehen, da sich die Clustergröße der vernetzten magnetischen Nanopartikel bis in den Mikrometer-Bereich entwickelt hat.

Messunsicherheit

Für die Angabe der Fehlerbalken in Abbildung 5.7 wird die empirische Auswertung aus Kapitel 5.3 benutzt. Sie ergibt eine bindungsunabhängige Messunsicherheit von $\pm 3\%$.

5.4.4 Bindungskinetik

Versuchsdurchführung

Es wurden vier Proben präpariert. Um die Abhängigkeit der Bindungskinetik vom Diffusionsweg der Partner zu zeigen, wurde der Gehalt an Nanopartikeln von Probe zu Probe verdoppelt (5 μL –40 μL). Zu jeder Probe wurde die entsprechende Menge an Biotin-BSA pipettiert, bei der die größte Clustergröße zu erwarten ist. Direkt nach dem Präparieren wurde die jeweilige Probe mit dem MRX-Forschungssystem mit 1500 Messzyklen der Standardparameter für flüssige Proben gemessen. Dies entspricht einer Gesamtmesszeit von 130 Minuten. Für die Messdatenauswertung wurden fünf Relaxationskurven gemittelt.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 5.9 ist die Bindungskinetik der vier Proben gezeigt. Als qualitatives Maß für die Vernetzung ist die Fläche unter den Relaxationskurven aufgetragen. Betrachtet man den Übergang in die Sättigung, ergibt eine Verdopplung der Bindungspartner eine etwa doppelt so schnelle Bindungsgeschwindigkeit. Hieraus lässt sich schließen, dass die Bindungspartner aufgrund der kürzeren Diffusionslängen schneller binden.

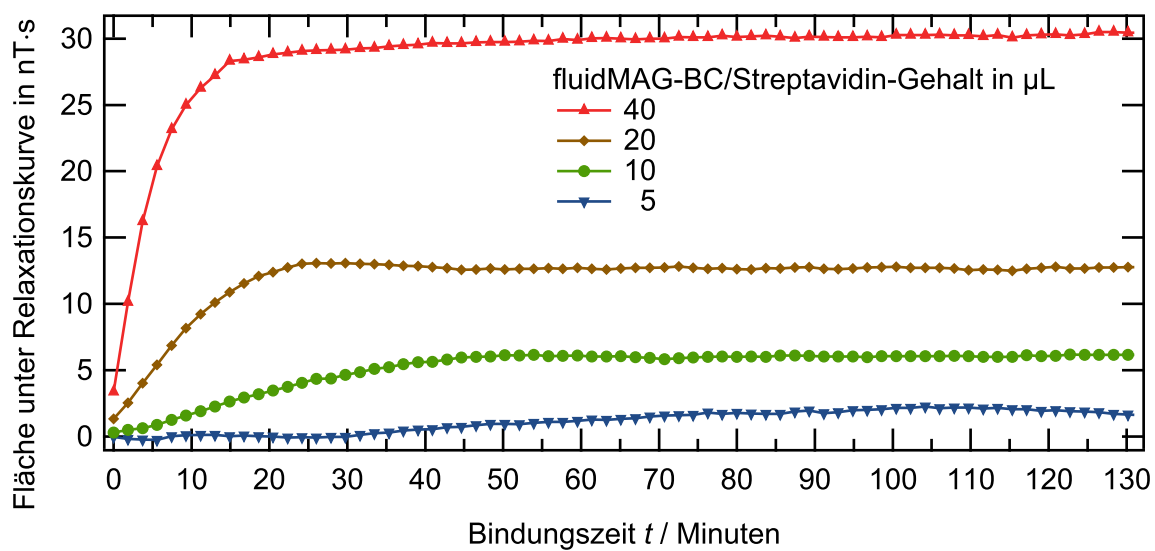


Abb. 5.9 – Bindungskinetik von Streptavidin-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln und biotinyliertem BSA von 1 Min. bis 130 Min. .

5.5 Charakterisierung von Hydrogelen

Hydrogele sind physikalisch oder chemisch verknüpfte Netzwerke aus Polymeren, die Wasser als flüssiges Medium aufnehmen [134]. Auf Basis der Relaxationseigenschaften von superparamagnetischen Nanopartikeln wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie und dem Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig ein neues Charakterisierungsverfahren für Hydrogele entwickelt [135, 136]. Bei diesem neuartigen Verfahren wird die Beweglichkeit von superparamagnetischen Nanopartikeln magnetisch gemessen. In einer früheren Arbeit wurde von Mayer et al. [137] die Beweglichkeit magnetischer Nanopartikel in Hydrogelen optisch mit der Relaxation der Doppelbrechung gemessen (siehe Kapitel 1.5). Über die Kenntnis der Beweglichkeit der magnetischen Nanopartikel können Eigenschaften des Hydrogels wie Vernetzungskinetik, Freisetzungskinetik, Einbettungskapazität und Mikroviskosität bestimmt werden. Zuerst werden die in diesem Abschnitt verwendeten Hydrogele und deren Synthese erläutert. Danach wird die Eignung von superparamagnetischen Nanopartikeln und der Einbau in Hydrogele beschrieben und die Charakterisierungsergebnisse werden diskutiert. Zum Abschluss wird ein kurzer Ausblick auf die nach Beendigung dieser Arbeit durchgeführten Freisetzungsversuche gegeben. Das hier vorgestellte Verfahren erlaubt es, Vorgänge innerhalb von Hydrogelen zerstörungsfrei zu erfassen. Die Übertragung der Anwendung auf Hydrogele mit anderer Zusammensetzung ist mit entsprechend suspendierten magnetischen Nanopartikeln möglich.

5.5.1 Hydrogele

Hydrogele werden im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 vom Institut für Technische Chemie der TU Braunschweig als Material für retardiert freisetzende Medikamentendepots hergestellt und untersucht. Sie sind in der Lage, das Vielfache ihres eigenen Gewichts an Wasser oder Puffer aufzunehmen, wodurch sie eine optimale Umgebung für medizinisch wirksame Proteine und Peptide bereitstellen. Die Bildung des Hydrogels findet in Gegenwart der Wirkstoffe statt, wodurch sie in dem Polymernetzwerk mechanisch eingeschlossen werden. Dieser Prozess muss so durchgeführt werden, dass die Funktion der Wirkstoffe nicht beeinflusst wird. Die Immobilisierung und kontrollierte Freisetzung der Wirkstoffe findet über einen längeren Zeitraum statt. Die Freisetzung der Wirkstoffe erfolgt bei Hydrogelen über zwei Mechanismen: Diffusion und Degradation des Netzwerks. Durch die Degradation des Netzwerks, z.B. durch Enzyme, Temperatur oder pH-Wertänderung, wird die Diffusion der Wirkstoffe aus dem Netzwerk beschleunigt.

Hydrogele-Synthese

Die untersuchten Hydrogele bestehen aus fotovernetzter Hydroxyethyl-Methacrylat-Hydroxyethylstärke (HESHEMA). HESHEMA wurde durch Modifikation von Hydroxyethylstärke (HES) mit Hydroxyethyl-Methacrylat (HEMA) synthetisiert. Die reaktiven Seitenketten (HEMA) sind statistisch über das HES-Rückgrat verteilt und bilden nach Aktivierung durch einen Fotoinitiator und UV-Lichtbestrahlung die Vernetzungspunkte im Gel (Abb. 5.10). Durch den Substitutionsgrad (DS) an HEMA kann die Maschen-

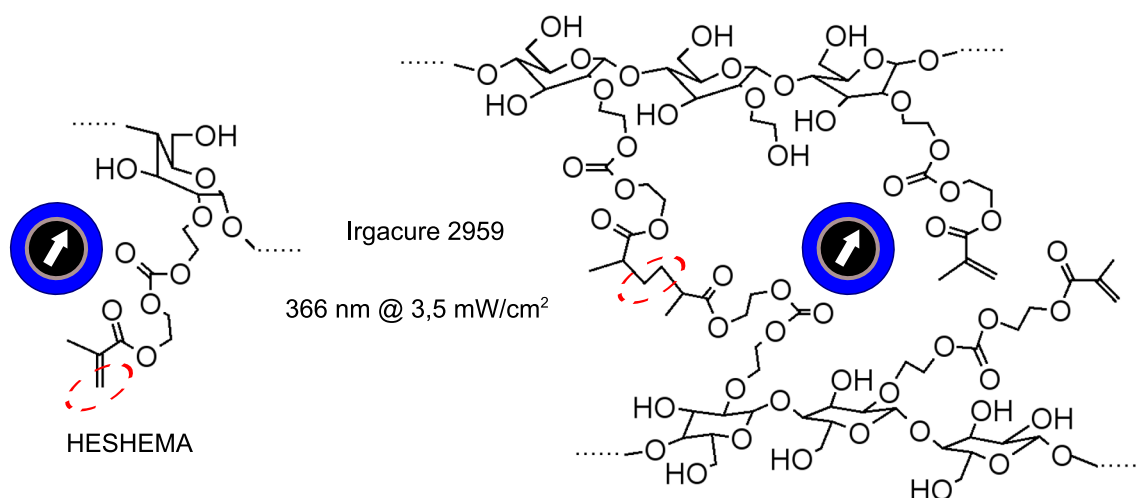


Abb. 5.10 – Schema der UV-Fotovernetzung des Hydrogels mit mechanisch eingebundenen superparamagnetischen Nanopartikeln. An den mit Ellipsen markierten Stellen brechen während der UV-Belichtung die Radikale des Fotoinitiators die Kohlenstoffdoppelbindungen und die HEMA-Substituenten vernetzen.

größe des Netzwerkes eingestellt werden [138]. Für die folgenden Experimente wurden 0,1 g/g HESHEMA mit einem DS von 0,07 in 1 mg/g wässrigem Fotoinitiator (Irgacure 2959, Ciba Speciality Chemicals, Basel, Switzerland) gelöst. Die Polymerisation erfolgte unter UV-Induzierung ($\lambda = 366 \text{ nm}$, $I \sim 3,5 \text{ mW/cm}^2$) und verläuft nach dem Prinzip einer radikalischen Additionsreaktion an den Doppelbindungen der HEMA-Struktur (in Abb. 5.10 mit Ellipsen markiert).

5.5.2 Einbau superparamagnetischer Nanopartikel

Die superparamagnetischen Nanopartikel sind in der gleichen Größenordnung wie die Proteine oder Peptide, die als Wirkstoffe in das Hydrogel immobilisiert werden sollen. Anstelle dieser werden die Nanopartikel als Sonde in das Hydrogel eingebaut. Die Immobilisierung der superparamagnetischen Nanopartikel erfolgt, wie auch der spätere Einbau von Wirkstoffen, während der Polymerisation des Hydrogels. Die HESHEMA-Ausgangslösung wird mit den Nanopartikeln vermischt. Anschließend findet die Polymerisation durch UV-Induzierung der vernetzbaren Substituenten in der Lösung statt. Hierbei werden die magnetischen Nanopartikel mechanisch im Netzwerk festgehalten. Die benutzten magnetischen Nanopartikel haben einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 50 nm (Herstellerangaben, gemessen mittels PCS). Dies entspricht der Größenordnung der später einzubauenden Wirkstoffe.

Die Messung des Hydrogels erfolgt in Anwesenheit von einzubauenden Stoffen und entspricht somit der im späteren Einsatz vorhandenen Situation. Abb. 5.11 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines gefriergetrockneten Hydrogels mit 5.11(a) und ohne 5.11(b) magnetische Nanopartikel. In REM-Aufnahmen ist eine Analyse nur im getrockneten Zustand möglich. Hieran ist nicht mehr zu erkennen, ob die sichtbaren magnetischen Nanopartikel (Abb. 5.11(b)) in den Poren des wässrigen

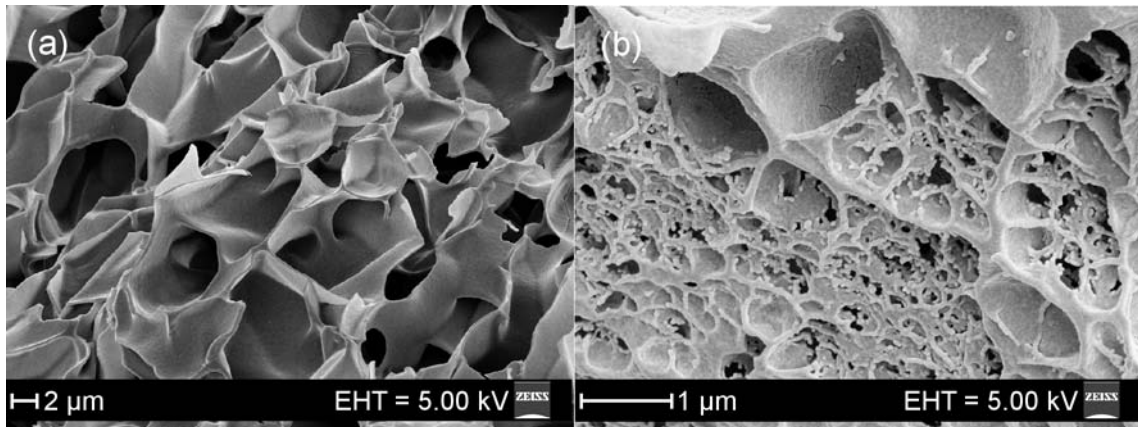


Abb. 5.11 – Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von gefriergetrockneten und goldbeschichteten Hydrogelen (a) ohne und (b) mit superparamagnetischen Nanopartikeln.

Hydrogels frei beweglich waren. Die Poren können durch Phasenseparation während der Herstellung der Hydrogele entstehen. Ein Indiz für die Existenz von Phasenseparation ist das trübe Erscheinungsbild der Hydrogele im wässrigen Zustand. Des Weiteren kann die Porengröße auch von der vorher durchgeführten Gefriertrocknung beeinflusst werden [139]. Mit der magnetischen Messung der Relaxation der magnetischen Nanopartikel ist es möglich, die Beweglichkeit der Partikel im trüben, wässrigen Zustand des Hydrogels zu messen. Man kann das Verhältnis von eingebauten zu frei beweglichen Partikeln bestimmen. Im Vergleich zu anderen Analysemethoden kann das Hydrogel bei magnetischen Messungen zerstörungsfrei gemessen werden. Bei Rheologiemessungen muss das Hydrogel eine dem Messaufbau angepasste Form haben, und die Eigenschaften werden durch die mechanische Belastung während der Messung verändert. Die Untersuchung der Freisetzung aus dem Hydrogel mit bekannten Methoden, wie z.B. der Diffusionsmessung, basieren darauf, den freigesetzten und aus dem Hydrogel diffundierten Wirkstoff zu detektieren. Die Vorgänge im Inneren des Hydrogels bleiben verborgen. Mit den magnetischen Sonden ist es möglich, Vorgänge innerhalb des Hydrogels zu analysieren. Zum einen kann die Bildung des Gels beobachtet werden und zum anderen auch dessen Degradation mit der Freisetzung der magnetischen Nanopartikel.

Untersuchung geeigneter Nanopartikel

Da der mechanische Einbau von Stoffen untersucht werden soll, müssen die magnetischen Nanopartikel unter den chemischen Vernetzungsbedingungen stabil bleiben. In dem Fall der untersuchten Hydrogele dürfen sich die Eigenschaften des Ferrofluids nicht unter dem Einfluss des Fotoinitiators, des UV-Lichts oder der entstehenden Radikale des Fotoinitiators während der Belichtung ändern. Daher wurden wässrige Ferrofluide mit unterschiedlichen Hüllenmaterialien untersucht. Für jedes Ferrofluid wurden drei unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Es wurden jeweils 1,2 μL des jeweiligen Ferrofluids in 150 μL VE-Wasser und 150 μL Fotoinitiator (1 mg/g Irgacure 2959) dispergiert und die Relaxationskurven gemessen. Danach wurden sowohl die VE-Wasser- als auch die Fotoinitiator-Proben 30 Minuten mit UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$, $I \sim 3,5 \text{ mW/cm}^2$)

belichtet. Eine Auswertung der Relaxationskurven erfolgte qualitativ. Dabei wurde die VE-Wasser-Probe als Referenz verwendet.

In Abbildung 5.12(a) sind die Relaxationskurven des stabilsten Ferrofluids fluidMAG-GA/GV zu sehen. Nur im vergrößerten Inset sind kleine Abweichungen der Relaxations-

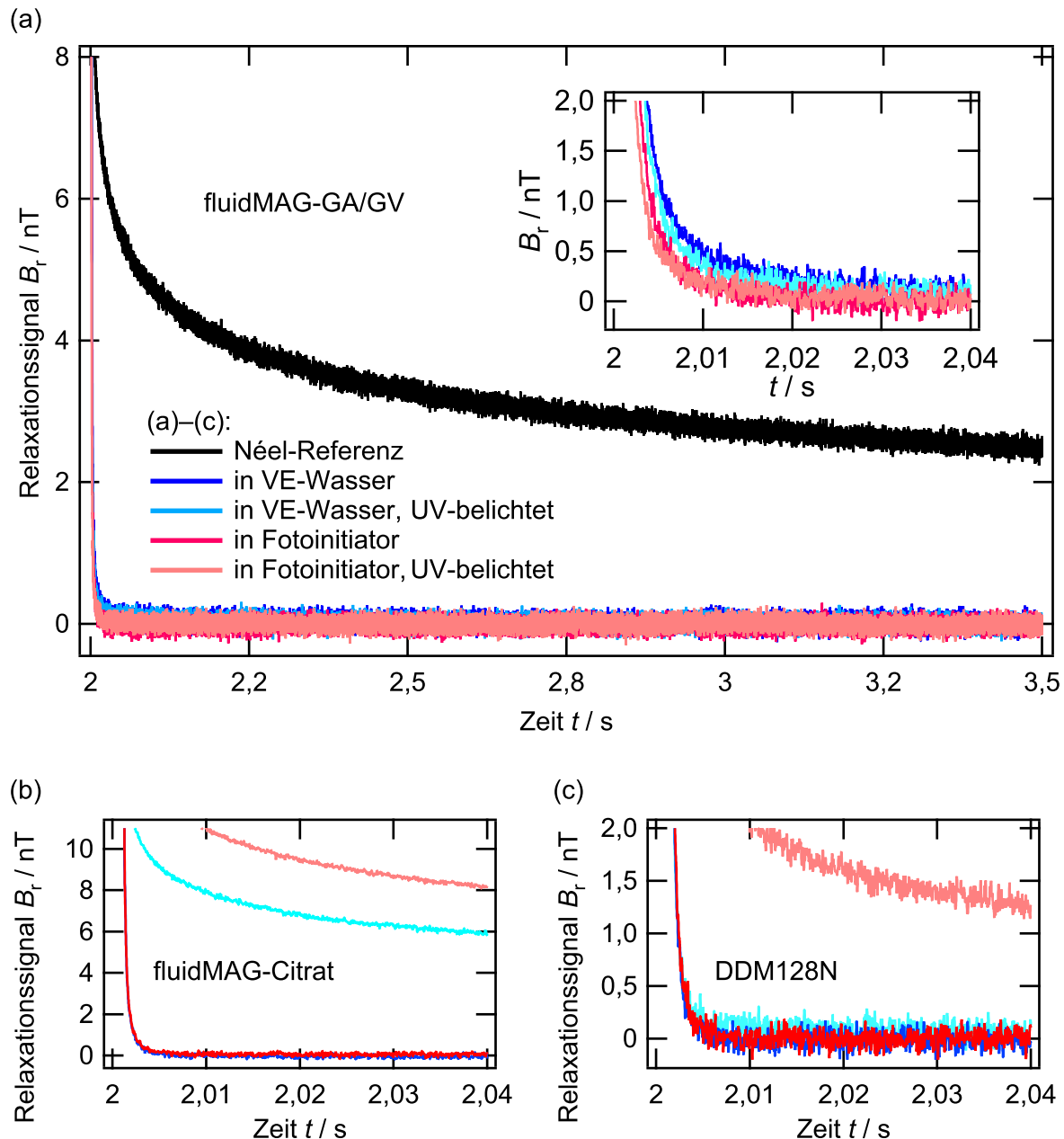


Abb. 5.12 – Ergebnisse des Stabilitätstests ausgewählter Ferrofluide. Untersucht wurde das Verhalten in Fotoinitiator (1 mg/g Irgacure 2959) und UV-belichtet in Wasser und Fotoinitiator.

geeignet: (a) fluidMAG-GA/GV mit Néel-Referenz zum Vergleich der Signaldynamik, Inset: Vergrößerung des Anfangsbereichs der Relaxation

nicht geeignet: (b) fluidMAG-Citrat, (c) DDM128N.

Tab. 5.6 – Ergebnisse der Eignungstests von Ferrofluiden mit verschiedenen Hüllenmaterialien unter dem Einfluss von Fotoinitiator sowie UV-belichtet in VE-Wasser und in Fotoinitiator.

Ferrofluid	Hülle	in Fotoinitiator	UV-belichtet in VE-Wasser	UV-belichtet in Fotoinitiator
fluidMAG-GA/GV	Gummi-Arabicum	stabil	stabil	stabil
fluidMAG-12/AS	Polyacrylsäure	stabil	stabil	starke Agglomeration
fluidMAG-D	Stärke-Monolayer	stabil	leichte Agglomeration	leichte Agglomeration
fluidMAG-D/5E	Stärke-Multilayer	stabil	stabil	starke Agglomeration
fluidMAG-Citrat	Citrat	stabil	starke Agglomeration	starke Agglomeration
DDM128N	Carboxy-Dextran	stabil	stabil	starke Agglomeration

kurven zu erkennen, die aber im Vergleich zur Néel-Referenz-Probe vernachlässigbar sind. Die Abbildung 5.12(b) und (c) zeigen Relaxationskurven von Ferrofluiden, die durch die Belichtung teilweise agglomerieren. Ein solches Verhalten ist für die weiteren Versuche nicht geeignet. Für das stabile Ferrofluid fluidMAG-GA/GV mit einer Gummi-Arabicum-Hülle wurde ein weiterer erfolgreicher Test mit 75 Minuten Belichtungsdauer durchgeführt. Dies stellt sicher, dass während der angestrebten maximalen Vernetzungszeit von 45 Minuten das Ferrofluid nicht agglomeriert. Die Ergebnisse aller Tests sind in Tabelle 5.6 aufgelistet.

Vernetzung von Hydrogelen mit superparamagnetischen Nanopartikeln

Fünf HESHEMA-Hydrogel-Belichtungsreihen wurden mit unterschiedlichem Ferrofluid-Gehalt von 4,6 mL/L bis 15,7 mL/L präpariert. Für jede Belichtungsreihe wurden 8 identische Proben mit 150 μ L Hydrogel-Lösung und einer zunehmenden Menge an Ferrofluid hergestellt. Die Tabelle 5.7 gibt eine Übersicht über die Bezeichnung und die Gehalte an Ferrofluid bzw. Nanopartikeln. Es ist die absolute Menge an Ferrofluid und die relative Menge bezogen auf 150 μ L Hydrogel angegeben. Die Menge an Nanopartikeln wurde mit Hilfe der Feststoffmenge von 75 mg/mL des Ferrofluids berechnet. Die Proben einer Belichtungsreihe wurden aufeinanderfolgend jeweils 5 Minuten länger belichtet und danach gemessen. Für die letzte Probe ergibt sich eine Belichtungszeit von 40 Minuten. Die Belichtung wurde mittels einer UV-Lampe ($\lambda = 366$ nm, $I \sim 3,5$ mW/cm²) durchgeführt. Als Probengefäß wurden Mikrotitergefäße aus Polystyrol (nunc-Immuno, Typ BreakApart, Polysorp) verwendet. Glasklares Standard-Polystyrol mit einer Dicke von 2 mm hat bei der verwendeten Wellenlänge von 366 nm eine Lichtdurchlässigkeit von etwa 75 % [140]. Die Mikrotitergefäße besitzen eine Wandstärke von 1,1 mm und

Tab. 5.7 – Daten der Belichtungsserien bezogen auf 150 μL Hydrogel.

Belichtungsserie	Ferrofluid-Gehalt in μL	Ferrofluid-Gehalt in mL/L	MNP-Gehalt in $\mu\text{g/g}$
I	0,4	2,7	38
II	0,7	4,6	67
III	1,2	7,9	114
IV	1,8	11,9	171
V	2,4	15,7	227

absorbieren das UV-Licht unwesentlich. Für jede Nanopartikel-Konzentration wurden mobile (Brown) und immobilisierte (Néel) Referenz-Proben hergestellt. Als Brown-Referenz wird jeweils eine unbelichtete Hydrogelprobe verwendet. Die Néel-Referenzen sind in gesättigter D-Mannit-Lösung gefriergetrocknete Proben. Mit den Referenzproben können die charakteristischen Eigenschaften des Ferrofluids, wie Größenverteilung und Relaxationszeitkonstanten, bestimmt werden. Sie werden auch benötigt, um die Anteile der mobilen und immobilisierten Nanopartikel zu trennen. Zusätzlich wurden die Nanopartikel in VE-Wasser suspendiert, um die höhere Viskosität der Hydrogel-Lösung zu zeigen.

5.5.3 Vernetzungskinetik und Einbettungskapazität

Mit Hilfe der magnetischen Nanopartikel können die Kinetik des Vernetzungsprozesses und die Einbettungskapazitäten der Hydrogel-Belichtungsserien bestimmt werden. Die Auswertung erfolgt mit der im Kapitel 1.6.2 beschriebenen phänomenologischen Auswertung des Relaxationsverhaltens. Diese Beschreibung eignet sich zur Auswertung von Versuchen, bei denen eine Immobilisierung der Nanopartikel erfolgt. Während der Vernetzung wird sich die Viskosität der Hydrogel-Lösung verändern und die Nanopartikel werden mechanisch im Netzwerk immobilisiert. Durch den Einbau der magnetischen Nanopartikel in das Hydrogelnetzwerk ist eine Sedimentation durch Agglomeration wie z.B. bei Kopplungsexperimenten ausgeschlossen. Die Einflüsse der Sedimentation auf die Relaxationskurven, die in Kapitel 3.3.2 beschrieben sind, brauchen nicht beachtet zu werden. In Abbildung 5.13 sind Fotografien der Proben aller Belichtungsserien nach den Belichtungen gezeigt. Die erste Probe in jeder Reihe ist 5 Minuten und die letzte 40 Minuten belichtet. Die Nanopartikel-Konzentrationen erhöhen sich von Abbildung 5.13(a) zu Abbildung 5.13(e). Für einen ersten Test der Vernetzung wurden die Probengefäße auf den Kopf gestellt. Ist der Vernetzungsgrad so hoch, dass die Hydrogel-Lösung am Boden verbleibt, spricht man von einem Gel. Dieser Test wird als „vial inversion test“ bezeichnet [141]. Es ist zu erkennen, dass mit höherer Nanopartikel-Konzentration die Belichtungsdauer für die Gelbildung zunimmt. Wie viele Nanopartikel in das Netzwerk eingebaut sind, kann aus den Fotografien nicht entnommen werden. Diese Information kann, wie folgt beschrieben, aus Magnetrelaxationsmessungen gewonnen werden.

Auswertung

In Abbildung 5.14 sind die Relaxationskurven des Vernetzungsprozesses und der Referenzproben von rein mobilen (Brown-Referenz, magnetische Nanopartikel in Hydrogel-Lösung) und rein immobilisierten magnetischen Nanopartikeln (Néel-Referenz, gefriergetrocknet in gesättigter D-Mannit-Lösung) der Hydrogel-Belichtungsserie II aufgetragen. Zusätzlich ist eine Probe in VE-Wasser gezeigt. An ihr lässt sich die längere Relaxationszeit aufgrund der höheren Viskosität der Hydrogel-Lösung erkennen. Die Relaxationskurven wurden direkt nach der jeweiligen UV-Belichtung mit dem MRX-Forschungssystem aufgenommen.

In Abbildung 5.15(a) ist der zeitliche Verlauf der ungebundenen und immobilisierten Anteile der Belichtungsserie II dargestellt. Die Auswertung erfolgt mit dem im Kapitel 1.6.2 eingeführten phänomenologischen Superpositions-Modell 1.48:

$$B_r(t) = B_{\text{ungebunden}} \cdot \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_{\text{ungebunden}}} \right)^\beta \right] + B_{\text{immobilisiert}} \cdot \ln \left(1 + \frac{\tau_{\text{immobilisiert}}}{t} \right) + B_{\text{Offset}} . \quad (5.3)$$

Der Anteil gebundener und immobilisierter Nanopartikel wurde mit Hilfe der Referenzproben berechnet. Da sich die Viskosität bei der Polymerisation ändert, wird überprüft, bei welchen Bedingungen die Auswertung mit dem phänomenologischen Superpositions-Modell (5.3) durchführbar ist. Hierzu wurden die Kurvenanpassungen der Relaxationskurven für unterschiedliche Bedingungen der Parameter untersucht, wobei β und $\tau_{\text{immobilisiert}}$ immer konstant gehalten wurden:

- Methode 1: $\tau_{\text{ungebunden}}$ aus Brown-Referenz konstant und Anteile der gebundenen und ungebundenen MNPs anhand der Amplituden $B_{\text{ungebunden}}$ und $B_{\text{immobilisiert}}$ müssen 100 % ergeben.

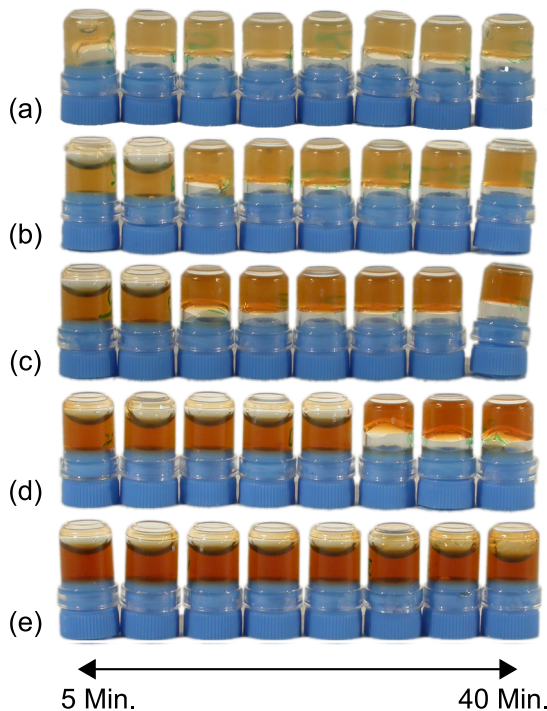


Abb. 5.13 – Fotografien der „vial inversion tests“ der Hydrogel-Belichtungsserien. UV-Belichtungszeiten von 5 bis 40 Minuten in 5 Minuten Schritten:

- (a) I. 2,7 mL/L Ferrofluid.
- (b) II. 4,6 mL/L Ferrofluid.
- (c) III. 7,9 mL/L Ferrofluid.
- (d) IV. 11,9 mL/L Ferrofluid.
- (e) V. 15,7 mL/L Ferrofluid.

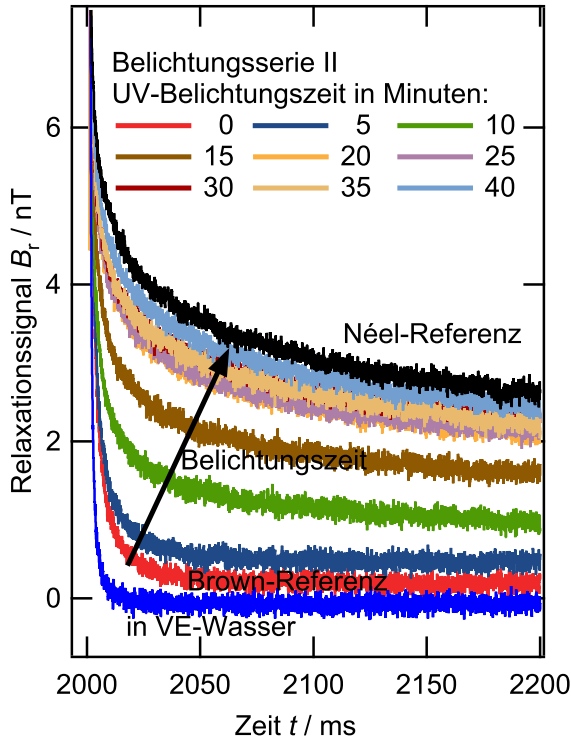


Abb. 5.14 – Zeitlicher Verlauf der Relaxationskurven der Hydrogel-Belichtungsserie II und der Referenzproben von rein mobilen (Brown-Referenz, MNPs in unbelichteter Hydrogel-Lösung) und rein immobilisierten MNPs (Néel-Referenz, MNPs gefriergetrocknet in gesättigter D-Mannit-Lösung). Zusätzlich ist die in VE-Wasser verdünnte Probe dargestellt, um den Einfluß der höheren Viskosität der Hydrogel-Lösung zu demonstrieren.

- Methode 2: $\tau_{\text{ungebunden}}$ aus Brown-Referenz konstant und keine Bedingung an die Amplituden.
- Methode 3: $\tau_{\text{ungebunden}}$ frei und Anteile der gebundenen und ungebundenen MNPs anhand der Amplituden $B_{\text{immobilisiert}}$ und $B_{\text{ungebunden}}$ müssen 100 % ergeben.
- Methode 4: $\tau_{\text{ungebunden}}$ frei und keine Bedingung an die Amplituden.

Da die Probenpräparation den größten Anteil an der Messunsicherheit hat, wurden die charakteristischen Eigenschaften der ungebundenen und immobilisierten magnetischen Nanopartikel mit mehreren Proben und Konzentrationen bestimmt. Für die mobilen Referenzen wurde für jede Konzentration jeweils eine unbelichtete Hydrogel-Lösung vermessen. Für die immobilisierten Referenzen wurden für jede Konzentration zwei Proben präpariert. Die Relaxationskurven wurden mit den Modellfunktionen (1.50) und (1.49) angepasst. Um einen Schätzwert für die Messunsicherheit zu erhalten, wurde für die daraus resultierenden Koeffizienten $B_{\text{ref,ungebunden}}$ und $B_{\text{ref,immobilisiert}}$ eine lineare Regression durchgeführt. Die Standardunsicherheiten ergaben für $B_{\text{ref,ungebunden}}$ 4,8 % und für $B_{\text{ref,immobilisiert}}$ 2,6 %. Eine Berechnung der Unsicherheitsfortpflanzung, die diese Standardunsicherheiten für die Probe und Referenzprobe berücksichtigt, ergibt eine kombinierte Standardunsicherheit von 6,5 % für immobilisierte Anteile. Diese Standardunsicherheit ist in den Abbildungen 5.15 und 5.16 eingezeichnet. In Abbildung 5.15(a) und 5.15(c) sind für die Belichtungsserien II und IV die Anteile immobilisierter (dunkel) und ungebundener (hell) Nanopartikel für alle Methoden dargestellt. Die immobilisierten Anteile sind bei allen Methoden gleich. Da bei den Methoden 2 und 4 die Amplituden ungebundener und immobilisierter Nanopartikel unabhängig sind, wird der Anteil ungebundener Nanopartikel aufgrund der sich ändernden Viskosität nicht richtig bestimmt.

Die Methoden 3 und 4 ergeben für die Zeitkonstante $\tau_{\text{ungebunden}}$ unterschiedliche, aber über die Belichtungszeit konstante Ergebnisse (Abbildung 5.15(b) und 5.15(d)). Die dreifache Zunahme der nach Methode 3 bestimmten Zeitkonstanten $\tau_{\text{ungebunden}}$ in Abbildung 5.15(b) lässt auf eine leichte Mikroviskositätsänderung schließen, so dass sich ungebundene Nanopartikel in wässrigen Poren aufhalten sollten. Für den zeitlichen Verlauf der Anteile immobilisierter Nanopartikel liefern alle Methoden eine robuste Kurvenanpassung. Der Anteil der ungebundenen Nanopartikel kann mit den Methoden 3 und 4 nicht zuverlässig bestimmt werden. Für die anderen Belichtungsreihen sind die

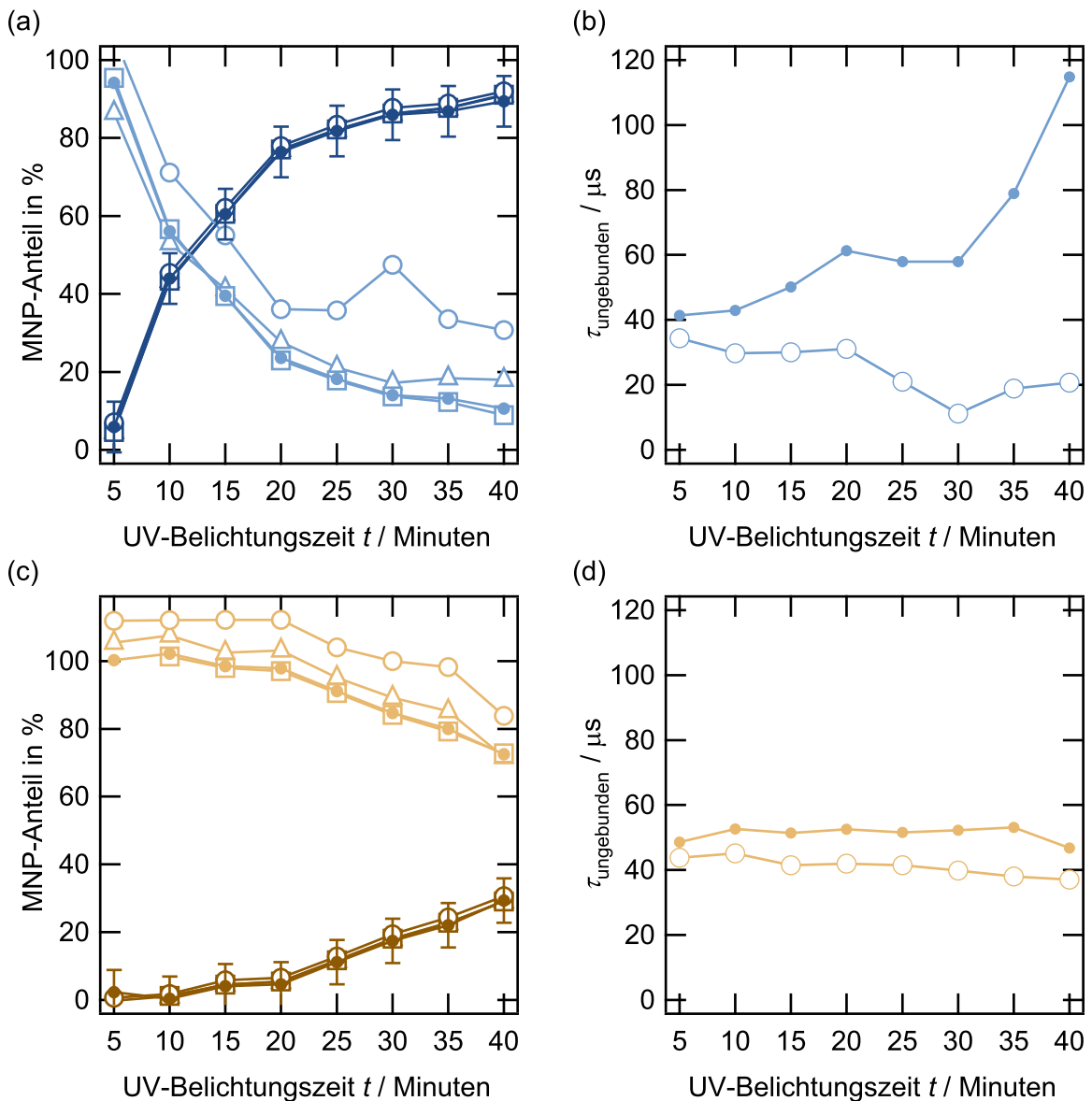


Abb. 5.15 – Zeitlicher Verlauf der Parameter $B_{\text{ungebunden}}$, $\tau_{\text{ungebunden}}$ (hell) und $B_{\text{immobilisiert}}$ (dunkel). \square Methode 1, \triangle Methode 2, \bullet Methode 3, \circ Methode 4. Standardunsicherheit für alle immobilisierten Anteile identisch. $k = 1$.

(a) und (b) II. Belichtungsserie 4,6 mL/L Ferrofluid,

(c) und (d) IV. Belichtungsreihe 11,9 mL/L Ferrofluid.

Ergebnisse äquivalent. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Anteil immobilisierter Nanopartikel verlässlich bestimmt werden kann und der Anteil an noch ungebundenen Nanopartikeln sich daraus ableiten lässt.

Bestimmung der Vernetzungskinetik

In Abbildung 5.16 ist der Anteil der immobilisierten Nanopartikel in Abhängigkeit der UV-Belichtungszeit für alle Belichtungsserien aufgetragen. Die Probe der Belichtungsreihe IV bei 30 Minuten fehlt, da sie aufgrund eines Präparationsfehlers zu wenig Hydrogel enthielt (siehe Abb. 5.13). Für die Serie I mit der geringsten Konzentration an magnetischen Nanopartikeln sind nach 40 Minuten ca. 86 % der Nanopartikel im Hydrogel-Netzwerk immobilisiert. Im Gegensatz hierzu sind in der Belichtungsreihe V nach 40 Minuten nur 34 % Nanopartikel eingebettet und eine Sättigung der Einbettung ist noch nicht zu erkennen. Auf dem Foto 5.13(e) ist nach dieser Zeit noch kein Gel zu erkennen. Die längere Vernetzungskinetik mit steigendem Nanopartikel-Gehalt ist nicht nur auf die größere Menge an Einbettungsmaterial zurückzuführen, sondern auch auf die hohe UV-Absorption von Eisen. Es ist also durchaus möglich, dass bei längerer Belichtung mehr Partikel eingebettet werden.

Bestimmung der Einbettungskapazität

Aus Abbildung 5.16 können auch Informationen über die Einbettung von Nanopartikeln ausgewertet werden. Vergleicht man den „vial inversion test“ mit den quantitativen Daten aus Abbildung 5.16, erhält man ein Gel, wenn mehr als ca. 40 % der Nanopartikel eingebettet sind. Keine Belichtungsreihe bettet 100 % der Nanopartikel ein. Dies ist durch wässrige Poren im Hydrogel zu erklären, die auch der Grund für das poröse Aussehen

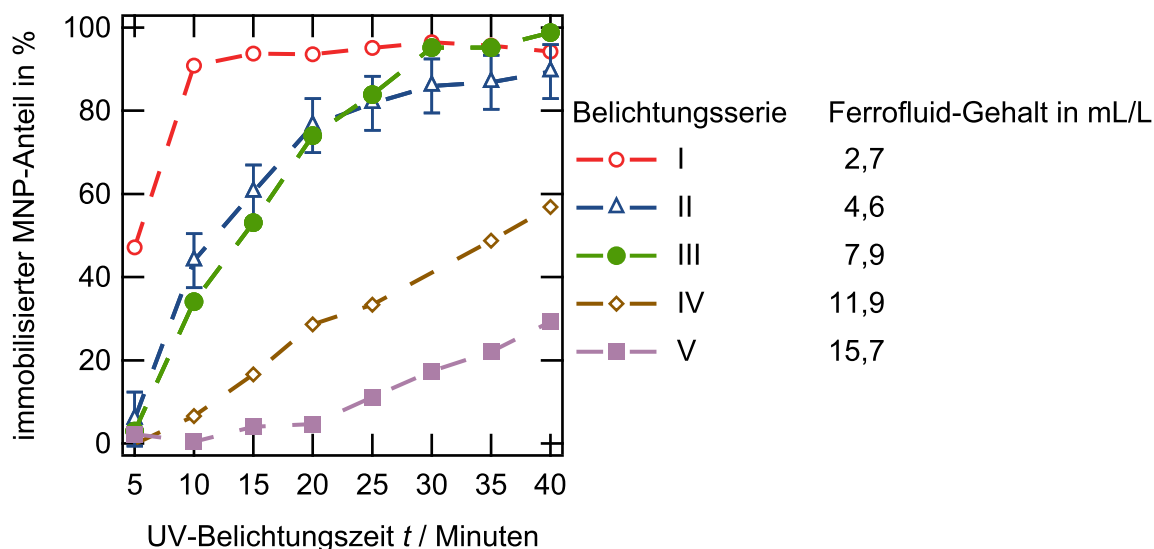


Abb. 5.16 – Vernetzungskinetiken der Belichtungsserien I-V. Standardunsicherheit für alle immobilisierten Anteile identisch. $k = 1$.

der REM-Aufnahmen sein können. In diesen wässrigen Poren können sich noch mobile Nanopartikel aufhalten. Aufgrund des Sättigungsverhaltens der Belichtungsserien I bis II kann eine garantierte Einbettungskapazität von 7,9 mL/L Ferrofluid oder 114 $\mu\text{g/g}$ Nanopartikel innerhalb von 40 Minuten angegeben werden. Mit diesem Ergebnis können weitere Versuche geplant und durchgeführt werden. Es wurden mit dem Institut für Technische Chemie und dem Institut für Pharmazeutische Technologie erfolgreich Hydrogel-Mikrosphären mit dieser Konzentration an Nanopartikeln hergestellt [142].

5.5.4 Freisetzungskinetik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden superparamagnetische Nanopartikel auf ihre Eignung als Sonde zur Hydrogel-Charakterisierung untersucht. Mit den geeigneten Nanopartikeln wurden die Vernetzungskinetik und die Einbettungskapazität von fotovernetzten Hydrogelen in Abhängigkeit der einzubettenden Stoffmenge untersucht. Für die Anwendung als zeitgesteuertes Medikamentendepot ist die Charakterisierung der Freisetzungskinetik von Interesse. Hierzu zeigten erste Freisetzungsversuche in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie und dem Institut für Pharmazeutische Technologie, dass sich die magnetischen Nanopartikel während eines enzymatischen Abbaus des Hydrogel-Netzwerks größenabhängig lösen. Diese ersten Freisetzungsversuche haben gezeigt, dass die superparamagnetischen Nanopartikel mit Gummi-Arabicum-Hülle mechanisch im Hydrogel-Netzwerk immobilisiert werden. Über die qualitative Untersuchung des Hüllenmaterials mit dem MRX-Verfahren konnten geeignete Nanopartikel gefunden werden. In späteren Arbeiten können mit diesem Ergebnis weitere Untersuchungen der Freisetzungskinetik, z.B. in Abhängigkeit von der Maschenweite des Hydrogel-Netzwerks, durchgeführt werden.

5.6 Schlussfolgerungen

Die Anwendungen in diesem Kapitel zeigen, dass das auf Fluxgate-Sensoren basierende MRX-Verfahren für den Einsatz in der Bioanalytik geeignet ist. Durch den Einsatz von Raumtemperatursensoren und durch die Portabilität des Systems kann das MRX-Verfahren kostengünstig in anderen Einrichtungen eingesetzt werden. Mit der Verwendung von magnetischen Nanopartikeln als Marker ist es möglich, Nachweistests für Biomoleküle zu entwickeln, die ein lineares Signal über einen großen Bereich des Analytgehalts liefern. Der schnelle Messzyklus erlaubt es, Kinetiken im Sekundenbereich zu beobachten. Die Auswertung des Relaxationsverhaltens in Anwendungen, bei denen die Relaxationsart der magnetischen Nanopartikel vom Brownschen zum Néelschen Mechanismus wechselt, kann mit dem phänomenologischen Superpositions-Modell sehr zuverlässig durchgeführt werden. Hierzu genügt im einfachsten Fall eine Probe des vollständig immobilisierten Ferrofluids als Referenz.

Bei der Hydrogel-Charakterisierung wurde gezeigt, wie magnetische Nanopartikel qualitativ auf ihre Eignung für eine bestimmte Anwendung getestet werden können. Allein die Veränderung der Relaxationskurven kann eine Agglomeration der magnetischen Nanopartikel aufzeigen. Ein Vergleich der Messunsicherheit des Messsystems und der

Probenpräparationen in der Anwendung zeigt, dass hauptsächlich auf eine sorgfältige Probenpräparation geachtet werden muss.

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Messgerät entwickelt und charakterisiert, mit dem die Magnetrelaxation magnetischer Nanopartikel mit hochempfindlichen Magnetfeldsensoren ohne aufwendige, magnetische Abschirmung bei Raumtemperatur gemessen werden kann. Hierzu wurde eine Messeinheit aufgebaut, die aus Spulen zur stufenförmigen Aufmagnetisierung der Probe besteht und in der zwei Fluxgate-Magnetometer zum Messen des Streufelds integriert sind. Eine differentielle Anordnung der zwei Fluxgate-Magnetometer erlaubt es, magnetische Störsignale zu unterdrücken und das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Zum stufenförmigen Aufmagnetisieren wurde eine Spulenelektronik entwickelt, die einen konstanten Spulenstrom in Bruchteilen der Spulenzeitkonstanten schaltet. Für die Messung und die Auswertung der Messdaten wurden Programme entwickelt und die Messunsicherheit sowie die Nachweisgrenze des Systems wurden in Hinblick auf Messungen von kleinsten Konzentrationen an magnetischen Nanopartikeln und Biomolekülen bestimmt.

Mit dem aufgebauten Messsystem wurden Bindungsexperimente mit superparamagnetischen Nanopartikeln an verschiedenen großen Zielsubstanzen durchgeführt, wobei Bindungskinetiken untersucht werden konnten. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 „Vom Gen zum Produkt“ wurde das Verfahren der Magnetrelaxometrie erstmals eingesetzt, um die Vernetzungskinetik und Einbettungskapazität von Hydrogelen zu bestimmen. Nachdem die Messeinheit in einem ersten Forschungssystem getestet und eingesetzt worden war, wurde ein Demonstrator eines kompletten Messsystems inklusive Messdatenauswertung in der Größe eines 19“-Gehäuses aufgebaut. Ein solches Laborgerät ermöglicht die kostengünstige Qualitätssicherung und Anwendung von magnetischen Nanopartikeln in der Forschung und Industrie.

Ausblick

Direkte weiterführende Aufgaben im Sonderforschungsbereich 578 sind die Entwicklung eines spezifischen Nachweistests mit Antikörpern-funktionalisierter magnetischer Nanopartikel sowie die systematische Untersuchung der Freisetzungskinetik von unterschiedlichen Hydrogel-Netzwerken auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit.

Mit dem entwickelten Laborgerät besteht die Möglichkeit, Ferrofluide auf verschiedene Weise zu untersuchen. Es können quantitative Aussagen über die Größenverteilung der magnetischen Nanopartikel getroffen werden. Auch eine Untersuchung der Nanopartikel auf Biokompatibilität, Agglomeration oder Koagulation in biologischen Medien kann durchgeführt werden. Oft ist auch ein qualitativer Vergleich von Relaxationskurven aussagekräftig, um Einflüsse auf das Ferrofluid zu entdecken. Das Laborgerät ermöglicht es, sowohl Herstellern als auch Anwendern von Ferrofluiden magnetische Nanoteilchen zu charakterisieren. Es kann z.B. die Funktionalisierung neu entwickelter Nanopartikel

getestet werden und vor Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin die Qualität der Nanopartikel überprüft werden.

Des Weiteren können magnetische Nanopartikel schon während der Herstellung auf ihre Größenverteilung für das Verfahren der Magnetrelaxometrie optimiert werden. Mit einem optimierten Ferrofluid lässt sich die Nachweisgrenze von Biomolekülen sehr verbessern, da bei heutigen Ferrofluiden aufgrund der breiten Größenverteilung nicht alle Nanopartikel zum Signal beitragen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Laborgerät wird aktuell bei einem Hersteller für magnetische Nanoteilchen erprobt. Für weitere Einsätze bei Herstellern und Anwendern werden zwei Laborgeräte der nächsten Generation fertiggestellt.

Eigene Veröffentlichungen und Publikationen

Veröffentlichungen in Zeitschriften

Teile dieser Arbeit und Ergebnisse von Kooperationen sind veröffentlicht in:

1. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Binding assays with streptavidin-functionalized superparamagnetic nanoparticles and biotinylated analytes using fluxgate magnetorelaxometry*, J. Magn. Magn. Mater. **321**, 1628–1631 (2009).
2. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Characterization of magnetic core-shell nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry, ac susceptibility, transmission electron microscopy and photon correlation spectroscopy – a comparative study*, J. Magn. Magn. Mater. **321**, 1644–1647 (2009).
3. Steffen Harling, Erik Heim, Ariane Schwoerer, Frank Ludwig, Meinhard Schilling und Henning Menzel, *Hydrogel characterisation: Swelling versus fluxgate magnetorelaxometry*, J. Controlled Release **132**, e68–e69 (2008).
4. Erik Heim, Steffen Harling, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Fluxgate Magnetorelaxometry for Characterization of Hydrogel Polymerization Kinetics and Entrapment Capacity*, J. Phys.: Condens. Matter **20**, 204106-1–5 (2008).
5. Mathias Feyen, Erik Heim, Frank Ludwig und Annette M. Schmidt, *Magnetic Nanorotors with Tailored Field-induced Dynamics*, Chem. Mater. **20**, 2942–2948 (2008).
6. Frank Ludwig, Erik Heim, Meinhard Schilling und Keiji Enpuku, *Characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry for use in biomedical applications*, J. Appl. Phys. **103**, 07A314-1–3 (2008).
7. Erik Heim, Frank Ludwig, Rainer Piel, Wenzhong Liu und Meinhard Schilling, *Magnetic Nanoparticle Analyzer for Magnetic Nanoparticle Characterization and Binding Assays*, Biomed Tech **52** (2007).

8. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Characterization of superparamagnetic nanoparticles by analyzing the magnetization and relaxation dynamics using fluxgate magnetometers*, J. Appl. Phys. **101**, 113909-1–10 (2007).
9. Keiji Enpuku, Tsuyoshi Tanaka, Takashi Matsuda, Hiroyuki Kuma, Feng Dang, Naoya Enomoto, Junichi Hojo, Kohji Yoshinaga, Frank Ludwig, Fatemeh Ghaffari, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Liquid Phase Immunoassay Using Magnetic Markers and Superconducting Quantum Interference Device*, Jpn. J. Appl. Phys. **46**, 7524–7529 (2007).
10. Keiji Enpuku, Tsuyoshi Tanaka, Takashi Matsuda, Feng Dang, Naoya Enomoto, Junichi Hojo, Kohji Yoshinaga, Frank Ludwig, Fatemeh Ghaffari, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Properties of magnetic nanoparticles in the Brownian relaxation range for liquid phase immunoassays*, J. Appl. Phys. **102**, 054901-1–7 (2007).
11. Erik Heim, Steffen Harling, Kai Pöhlig, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*, J. Magn. Magn. Mater. **311**, 150–154 (2006).
12. Frank Ludwig, Erik Heim, Dirk Menzel und Meinhard Schilling, *Investigation of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry for use in magnetic relaxation immunoassays*, J. Appl. Phys. **99**, 08P106-1–3 (2006).
13. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling *Investigation of magnetic nanoparticles for the quantitative and specific analysis of biomolecules with magnetorelaxometry*, Biomed Tech **50**, 613–614 (2005).
14. Frank Ludwig, Erik Heim, Sascha Mäuselein, Dietmar Eberbeck und Meinhard Schilling, *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets*, J. Magn. Magn. Mater. **293**, 690–695 (2005).
15. Frank Ludwig, Sascha Mäuselein, Erik Heim und Meinhard Schilling *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement*, Rev. Sci. Instrum. **76**, 106102-1–3 (2005).
16. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Analysis of biological target concentrations in solution by magnetorelaxometry*, Biomed Tech **49**, 420–421 (2004).

17. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles – a new method for the quantitative and specific analysis of biomolecules*, 4th IEEE Conference on Nanotechnology, 245–248 (2004).

Präsentierte Vorträge und Posterbeiträge auf Tagungen

Vorträge

1. Erik Heim, *Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Nanoteilchen in der Bioanalytik*, Kernphysikalisches Kolloquium, Helmholtz-Institut für Strahlen- und Kernphysik, 19. Juni 2008, Bonn, Deutschland.
2. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Investigation of binding assays with streptavidin functionalized superparamagnetic nanoparticles and biotinylated analytes by fluxgate magnetorelaxometry*, 8th German Ferrofluid Workshop, 7.-9. Mai 2008, Mainz, Deutschland.
3. Erik Heim, Amel Charni, Frank Ludwig, Meinhard Schilling, *Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Fe_3O_4 -Nanoteilchen in Streptavidin-Biotin Bindungsassays*, 72. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 25.-29. Februar 2008, Berlin, Deutschland.
4. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *A fluxgate magnetorelaxometry-based measurement technique for the quality control of magnetic core-shell nanoparticles for applications in medicine and bioanalytics*, 72. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 25.-29. Februar 2008, Berlin, Deutschland.
5. Erik Heim, Steffen Harling, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Fe_3O_4 -Nanoteilchen für die Charakterisierung von Hydrogelen*, 71. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 26.-30. März 2007, Regensburg, Deutschland.
6. Erik Heim, Steffen Harling, Kai Pöhlig, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*, 6th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, 17.-20. Mai 2006, Krems, Österreich.
7. Erik Heim, Kai Pöhlig, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Investigation of biological research issues with superparamagnetic nanoparticles by differential fluxgate magnetorelaxometry*, 70. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 27.-31. März 2006, Dresden, Deutschland.

8. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Investigation of magnetic nanoparticles for the quantitative and specific analysis of biomolecules with magnetorelaxometry*, 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik DGBMT, 14.-17. September 2005, Nürnberg, Deutschland.
9. Erik Heim, Frank Ludwig, Sascha Mäuselein und Meinhard Schilling, *Magnetrelaxometrie an magnetischen Nanoteilchen mit gradiometrischer Fluxgate-Anordnung*, 69. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 4.-9. März 2005, Berlin, Deutschland.
10. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Analysis of biological target concentrations in solution by magnetorelaxometry*, 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik DGBMT, 22.-24. September 2004, Ilmenau, Deutschland.
11. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers*, 68. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 8.-12. März 2004, Regensburg, Deutschland.

Posterbeiträge

1. Erik Heim, Frank Ludwig, Rainer Piel und Meinhard Schilling, *Magnetic nanoparticle analyzer for characterization and quality control of magnetic nanoparticles*, 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik DGBMT, 23.-27. November 2008, Antwerpen, Belgien.
2. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Bindings assays with streptavidin-functionalized superparamagnetic nanoparticles and biotinylated analytes by fluxgate magnetorelaxometry*, 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, 20.-24. Mai 2008, Vancouver, Kanada.
3. Erik Heim, Frank Ludwig, Rainer Piel, Wenzhong Liu und Meinhard Schilling, *Magnetic Nanoparticle Analyzer for Magnetic Nanoparticle Characterization and Binding Assays*, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik DGBMT, 26.-29. September 2007, Aachen, Deutschland.
4. Erik Heim, Steffen Harling, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and emplacement capacity*, 11th International Conference on Magnetic Fluids, 23.-27. Juli 2007, Košice, Slowakei.
5. Frank Ludwig, Fatemeh Ghaffari, Erik Heim, Keiji Enpuku, Junichi Hojo, Naoya Enomoto, Feng Dang, Kohji Yoshinaga und Meinhard Schilling, *Investigation of*

- the aggregation behavior of magnetite nanoparticle suspensions utilizing fluxgate magnetorelaxometry*, 11th International Conference on Magnetic Fluids, 23.-27. Juli 2007, Košice, Slowakei.
6. Erik Heim, Steffen Harling, Ariane Schwoerer, Frank Ludwig, Henning Menzel und Meinhard Schilling, *Superparamagnetische Nanoteilchen als Sonden für die Hydrogel-Charakterisierung mittels Fluxgate-Magnetorelaxometrie*, 7th German Ferrofluid Workshop, 25.-26. September 2006, Benediktbeuern, Deutschland.
 7. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Characterization of magnetic nanoparticles by analyzing the magnetization and relaxation dynamics using fluxgate magnetometers*, 7th German Ferrofluid Workshop, 25.-26. September 2006, Benediktbeuern, Deutschland.
 8. Kai Pöhlig, Erik Heim, Wenzhong Liu, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Preparation of superparamagnetic ferrofluids for the use in magnetorelaxometry for biological analysis*, 70. Frühjahrstagung des Arbeitskreises Festkörperphysik der DPG, 27.-31. März 2006, Dresden, Deutschland.
 9. Frank Ludwig, Erik Heim und Meinhard Schilling, *Investigation of the relaxation behavior of magnetite nanoparticles for magnetorelaxometry*, 88th International Bunsen-Discussion Meeting, Magnetic Colloidal Fluids: Preparation, Characterization, Physical Properties and Applications, 20.-22. Juli 2005, Saarbrücken, Deutschland.
 10. Erik Heim, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *Analytik-Projekte im Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik AG Schilling*, GVC/DECHEMA-Vortrags- und Diskussionstagung: Systembiotechnologie für industrielle Prozesse, 1.-4. Mai 2005, Braunschweig, Deutschland.
 11. Erik Heim, Frank Ludwig, Sascha Mäuselein und Meinhard Schilling, *Analysis of biological target concentrations in solution by magnetorelaxometry*, Kryoelektronische Bauelemente, 12.-14. September 2004, Goslar, Deutschland.
 12. Erik Heim, Sascha Mäuselein, Frank Ludwig und Meinhard Schilling, *High- T_c SQUID Magnetorelaxometry for the Analysis of Biological Target Concentration in Solution*, Applied Superconductivity Conference, 3.-8. Oktober 2004, Jacksonville, Florida USA.

Ausstellungen

1. Hannover Messe 2007, Gemeinschaftsstand des Landes Niedersachsen, *Magnetische Nanoteilchen für die Biotechnologie*, Exponat: MRX-Analyzer.

2. GeT Univation! 2007, German-Turkish University Conference and Project Marketplace on Applied Research and Innovation, *Magnetic Nanoparticle Analyzer, Applications of magnetic nanoparticles*, Exponat: MRX-Analyzer.

Literaturverzeichnis

- [1] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones und J. Dobson, *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics **36**, R167–R181 (2003).
- [2] W. Weitschies, R. Kötz, T. Bunte und L. Trahms, *Determination of relaxing or remanent nanoparticle magnetization provides a novel binding-specific technique for the evaluation of immunoassays*, Pharmaceutical and Pharmacological Letters **7**, 5–8 (1997).
- [3] R. Kötz, *Untersuchung des Relaxationsverhaltens von magnetischen Nanopartikeln und daraus abgeleitete Anwendungen für einen bindungsspezifischen Immunoassay*, Dissertation, Fachbereich Physik der Freien Universität Berlin (1997).
- [4] R. Kötz, J. Lange, T. Reinländer, W. Weitschies, W. Semmler, E. Romanus, J. Schambach, L. Warzemann, P. Weber, A. Haller, S. Hartwig, T. Kerberger, H. Matz und L. Trahms, *Supraleitung, Thema: Magnetrelaxometrie (MRX)*, Abschlussbericht, Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Förderkennzeichen: 13N7005/1 (2000).
- [5] European patent, EP0805983, W. Weitschies, R. Kötz, L. Trahms und T. Bunte, *Process and compounds for the magnetorelaxometric detection of analytes and use thereof* (2000).
- [6] J. Lange, *Spezifisch bindende magnetische Nanopartikel als Signalgeber in magnetischen Relaxationsmessungen*, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Greifswald (2001).
- [7] Vornorm, DIN V ENV 13005:1999-06, *Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen* (1999).
- [8] D. L. Huber, *Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles*, Small **1**, 482–501 (2005).
- [9] T. C. Yih und C. Wei, *Nanomedicine in cancer treatment*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **1**, 191–192 (2005).
- [10] D. J. Dunlop und O. Oezdemir, *Rock Magnetism*, Nummer 3 in Cambridge Studies in Magnetism, Cambridge University Press 1997.
- [11] D. L. Leslie-Pelecky und R. D. Rieke, *Magnetic Properties of Nanostructured Materials*, Chemistry of Materials **8**, 1770–1783 (1996).

- [12] C. Kittel, *Theory of the Structure of Ferromagnetic Domains in Films and Small Particles*, Physical Review **70**, 965 (1946).
- [13] A.-H. Lu, E. Salabas und F. Schüth, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*, Angewandte Chemie International Edition **46**, 1222–1244 (2007).
- [14] A. K. Gupta und M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials **26**, 3995–4021 (2005).
- [15] G. Nichols, S. Byard, M. J. Bloxham, J. Botterill, N. J. Dawson, A. Dennis, V. Diart, N. C. North und J. D. Sherwood, *A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization*, Journal of Pharmaceutical Sciences **91**, 2103–2109 (2002).
- [16] J. Muñoz, J. Cervantes, R. Esparza und G. Rosas, *Iron nanoparticles produced by high-energy ball milling*, Journal of Nanoparticle Research **9**, 945–950 (2007).
- [17] M. Wood, *Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications*, Journal of the Royal Society Interface **4**, 1–17 (2007).
- [18] S. E. Pratsinis und S. Vemury, *Particle formation in gases: A review*, Powder Technology **88**, 267–273 (1996).
- [19] S. Barcikowski und V. Szentpetery, *Maßgeschneiderte Partikel per Laser*, Technology Review **8**, 16 (2008).
- [20] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert und E. Duguet, *Magnetic nanoparticle design for medical applications*, Progress in Solid State Chemistry **34**, 237–247 (2006).
- [21] K. O’Grady, *Biomedical applications of magnetic nanoparticles*, Journal of Physics D: Applied Physics **36** (2002).
- [22] R. Weissleder, D. Stark, B. Engelstad, B. Bacon, C. Compton, D. White, P. Jacobs und J. Lewis, *Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*, American Journal of Roentgenology **152**, 167–173 (1989).
- [23] L. LaConte, N. Nitin und G. Bao, *Magnetic nanoparticle probes*, Materials Today **8**, 32–38 (2005).
- [24] J. W. M. Bulte und D. L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*, NMR in Biomedicine **17**, 484–499 (2004).
- [25] Y. Okuhata, *Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging*, Advanced Drug Delivery Reviews **37**, 121–137 (1999).
- [26] Y. Jun, J. Lee und J. Cheon, *Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging*, Angewandte Chemie International Edition **47**, 5122–5135 (2008).

-
- [27] E. Küstermann, U. Himmelreich, K. Kandal, T. Geelen, A. Ketkar, D. Wiedermann, C. Strecker, J. Esser, S. Arnhold und M. Hoehn, *Efficient stem cell labeling for MRI studies*, Contrast Media & Molecular Imaging **3**, 27–37 (2008).
 - [28] B. Gleich und J. Weizenecker, *Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles*, Nature **435**, 1214–1217 (2005).
 - [29] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix und P. Schlag, *Hyperthermia in combined treatment of cancer*, The Lancet Oncology **3**, 487–497 (2002).
 - [30] C. C. Berry und A. S. G. Curtis, *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics **36**, R198–R206 (2003).
 - [31] A. S. Lübke, C. Alexiou und C. Bergemann, *Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting*, Journal of Surgical Research **95**, 200–206 (2001).
 - [32] M. Schilling und F. Ludwig, *Advances in Solid State Physics*, Band 46, Kapitel Proteins and Patients - Magnetic Nanoparticles as Analytic Markers, (S. 83 – 93) (2008).
 - [33] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel und A. Radbruch, *High gradient magnetic cell separation with MACS*, Cytometry **11**, 231–238 (1990).
 - [34] A. Frenzel, C. Bergemann, G. Köhl und T. Reinard, *Novel purification system for 6xHis-tagged proteins by magnetic affinity separation*, Journal of Chromatography B **793**, 325–329 (2003).
 - [35] E. F. Kneller und F. E. Luborsky, *Particle Size Dependence of Coercivity and Remanence of Single -Domain Particles*, Journal of Applied Physics **34**, 656–658 (1963).
 - [36] K. Kopitzki und P. Herzog, *Einführung in die Festkörperphysik*, 5., durchges. Auflage, Teubner 2004.
 - [37] R. E. Rosenzweig, *Ferrohydrodynamics*, Cambridge University Press 1985.
 - [38] C. Ross, *Patterned magnetic recording media*, Annual Review of Materials Research **31**, 203–235 (2001).
 - [39] E. C. Stoner und E. P. Wohlfarth, *A Mechanism of Magnetic Hysteresis in Heterogeneous Alloys*, Royal Society of London Philosophical Transactions **A 240**, 599–642 (1948).
 - [40] I. S. Jacobs und C. P. Bean, *Magnetism III*, Kapitel Fine Particles, Thin Films and Exchange Anisotropy (Effects of Finite Dimensions and Interface on the Basic Properties of Ferromagnets, (S. 271–350), Academic Press (1963).
 - [41] F. Wiekhorst, E. Shevchenko, H. Weller und J. Kötzler, *Anisotropic superparamagnetism of monodisperse cobalt-platinum nanocrystals*, Phys. Rev. B **67**, 224416 (2003).

- [42] D. V. Berkov, P. Görnert, N. Buske, C. Gansau, J. Mueller, M. Giersig, W. Neumann und D. Su, *New method for the determination of the particle magnetic moment distribution in a ferrofluid*, Journal of Physics D: Applied Physics **33**, 331–337 (2000).
- [43] J. A. Potton, G. J. Daniell und D. Melville, *A new method for the determination of particle size distributions from superparamagnetic measurements*, Journal of Physics D: Applied Physics **17**, 1567–1581 (1984).
- [44] A. Einstein, *Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen [19, 289 (1906)]*, Annalen der Physik **14**, 229–247 (2005).
- [45] A. Einstein, *Berichtigung zu meiner Arbeit: Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen [34, 591 (1911)]*, Annalen der Physik **14**, 406–407 (2005).
- [46] M. Néel, *Théorie du trainage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites*, Ann. de Géophysique **5**, 99–109 (1949).
- [47] M. Néel, *Some Theoretical Aspects of Rock-Magnetism*, Adv. Phys. **4**, 191–243 (1955).
- [48] M. I. Shliomis und V. I. Stepanov, *Theory of the Dynamic Susceptibility of Magnetic Fluids*, Advances in Chemical Physics Series **87**, 1–30 (1994).
- [49] D. Eberbeck, S. Hartwig, U. Steinhoff und L. Trahms, *Description of the magnetization decay in ferrofluids with a narrow particle size distribution*, Magnetohydrodynamics **39**, 77–83 (2003).
- [50] R. W. Chantrell, B. K. Tanner und S. R. Hoon, *Determination of the Magnetic Anisotropy of Ferrofluids from Torque Magnetometry Data*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **38**, 83–92 (1983).
- [51] F. Ludwig, E. Heim und M. Schilling, *Characterization of superparamagnetic nanoparticles by analyzing the magnetization and relaxation dynamics using fluxgate magnetometers*, Journal of Applied Physics **101**, 113909 (2007).
- [52] F. Ludwig, E. Heim, D. Menzel und M. Schilling, *Investigation of superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry for use in magnetic relaxation immunoassays*, Journal of Applied Physics **99**, 08P106 (2006).
- [53] D. Eberbeck, V. Janke, S. Hartwig, U. Heyen, D. Schüler, M. Albrecht und L. Trahms, *Blocking of magnetic moments of magnetosomes measured by magnetorelaxometry and direct observation by magnetic force microscopy*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **289**, 70–73 (2005).
- [54] D. Eberbeck, F. Wieckhorst, U. Steinhoff und L. Trahms, *Aggregation behaviour of magnetic nanoparticle suspensions investigated by magnetorelaxometry*, Journal of Physics: Condensed Matter **18**, S2829–S2846 (2006).
- [55] R. Street und J. C. Woolley, *A Study of Magnetic Viscosity*, Proceedings of the Physical Society. Section A **62**, 562–572 (1949).

-
- [56] D. V. Berkov und R. Kötitz, *Irreversible relaxation behaviour of a general class of magnetic systems*, Journal of Physics: Condensed Matter **8**, 1257–1266 (1996).
 - [57] Z. L. Wang (Herausgeber), *Characterization of Nanophase Materials*, Wiley-VCH Verlag GmbH 2001.
 - [58] A. B. Pakhomov, Y. Bao und K. M. Krishnan, *Effects of surfactant friction on Brownian magnetic relaxation in nanoparticle ferrofluids*, in *49th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials*, Band 97, (S. 10Q305–3), AIP, Jacksonville, Florida (USA) (2005).
 - [59] M. Lederman, S. Schultz und M. Ozaki, *Measurement of the Dynamics of the Magnetization Reversal in Individual Single-Domain Ferromagnetic Particles*, Physical Review Letters **73**, 1986 (1994).
 - [60] S.-H. Chung, A. Hoffmann, K. Guslienko, S. D. Bader, C. Liu, B. Kay, L. Makowski und L. Chen, *Biological sensing with magnetic nanoparticles using Brownian relaxation (invited)*, 49th Annual Conference on Magnetism and Magnetic Materials **97**, 10R101 (2005).
 - [61] P. I. Nikitin, P. M. Vetoshko und T. I. Ksenevich, *New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **311**, 445–449 (2007).
 - [62] N. Pamme, *Magnetism and microfluidics*, Lab on a Chip **6**, 24–38 (2006).
 - [63] R. Kötitz, H. Matz, L. Trahms, H. Koch, W. Weitschies, T. Rheinländer, W. Semmler und T. Bunte, *SQUID Based Remanence Measurements for Immunoassays*, IEEE Transactions on Applied Superconductivity **7**, 3678–3681 (1997).
 - [64] K. Enpuku, K. Inoue, K. Soejima, K. Yoshinaga, H. Kuma und N. Hamasaki, *Magnetic immunoassays utilizing magnetic markers and a high- T_c SQUID*, IEEE Transactions on Applied Superconductivity **15**, 660–663 (2005).
 - [65] Schutzrecht, United States Patent 6607922, R. T. Laborde, *Immunochromatographic assay method and apparatus* (2003).
 - [66] B. H. Erne, K. Butter, B. W. M. Kuipers und G. J. Vroege, *Rotational Diffusion in Iron Ferrofluids*, Langmuir **19**, 8218–8225 (2003).
 - [67] S. H. Chung, A. Hoffmann, S. D. Bader, C. Liu, B. Kay, L. Makowski und L. Chen, *Biological sensors based on Brownian relaxation of magnetic nanoparticles*, Applied Physics Letters **85**, 2971–2973 (2004).
 - [68] A. P. Astalan, *Brownian Relaxation Measurements of Magnetic Nanoparticles: Towards the Development of a Novel Biosensor System*, Dissertation, Chalmers University of Technology (2007).
 - [69] E. Romanus, C. Groß, R. Kötitz, S. Prass, J. Lange, P. Weber und W. Weitschies, *Monitoring of biological binding reactions by magneto-optical relaxation measurements*, Magnetohydrodynamics **37**, 328–333 (2001).

- [70] Schutzrecht, WO/2001/011360, R. Kötitz, J. Lange, J. Browaeys, R. Perzynski, J.-C. Bacri, V. Ponsinet und T. Rheinlander, *Relaxation der Doppelbrechung magnetischer Nanopartikel während Bindungsreaktionen* (2005).
- [71] K. Aurich, G. Glockl, E. Romanus, P. Weber, S. Nagel und W. Weitschies, *Magneto-optical relaxation measurements for the characterization of biomolecular interactions*, Journal of Physics: Condensed Matter **18**, S2847–S2863 (2006).
- [72] J. Lange, R. Kötitz, A. Haller, L. Trahms, W. Semmler und W. Weitschies, *Magnetorelaxometry – a new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **252**, 381–383 (2002).
- [73] H. Matz, D. Drung, S. Hartwig, H. Groß, R. Kötitz, W. Müller, A. Vass, W. Weitschies und L. Trahms, *A SQUID measurement system for immunoassays*, Applied Superconductivity **6**, 577–583 (1999).
- [74] O. Behrsing und B. Micheel, *Grundlagen der Molekularen Medizin*, Springer Berlin Heidelberg 2008.
- [75] W. Luttmann, *Der Experimentator: Immunologie*, München ; Heidelberg : Elsevier, Spektrum, Akad. Verl. 2006.
- [76] H. Kuchling, *Taschenbuch der Physik*, Fachbuchverlag Leipzig - Köln 1994.
- [77] M. Schilling, *Höchstempfindliche Magnetfeldsensoren für den Niederfrequenzbereich*, Technisches Messen **68**, 261–268 (2001).
- [78] R. Kleiner, D. Koelle, F. Ludwig und J. Clarke, *Superconducting quantum interference devices: State of the art and applications*, Proceedings of the IEEE **92**, 1534–1548 (2004).
- [79] E. R. Flynn und H. C. Bryant, *A biomagnetic system for in vivo cancer imaging*, Physics in Medicine and Biology **50**, 1273–1293 (2005).
- [80] K. Enpuku, M. Hotta und A. Nakahodo, *High- T_c SQUID system for biological immunoassays*, Physica C: Superconductivity **357-360**, 1462–1465 (2001).
- [81] E. Romanus, T. Koettig, G. Glöckl, S. Prass, F. Schmidl, J. Heinrich, M. Gopinadhan, D. V. Berkov, C. A. Helm, W. Weitschies, P. Weber und P. Seidel, *Energy barrier distributions of maghemite nanoparticles*, Nanotechnology **18**, 115709 (2007).
- [82] F. Öisjöen, P. Magnelind, A. Kalabukhov und D. Winkler, *High- T_c SQUID gradiometer system for immunoassays*, Superconductor Science and Technology **21**, 034004 (2008).
- [83] C. Hinnrichs, J. Stahl, K. Kuchenbrandt und M. Schilling, *Dependence of sensitivity and noise of fluxgate sensors on racetrack geometry*, IEEE Transactions on Magnetism **37**, 1983–1985 (2001).

-
- [84] C. Bethke, H. Yakabchuk, V. Tarasenko, H. Hammer, E. Kisker, E. Koppers, S. Christoph, R. Zirwes und J. Müller, *Detektion superparamagnetischer Marker mittels GMI-Sensorik (Detection of superparamagnetic markers with GMI-Sensors)*, Technisches Messen **70**, 574–576 (2003).
 - [85] R. S. Beach und A. E. Berkowitz, *Giant magnetic field dependent impedance of amorphous FeCoSiB wire*, Applied Physics Letters **64**, 3652–3654 (1994).
 - [86] D. Robbes, C. Dolabdjian, Y. Monfort und P. Ciureanu, *Feasibility of an intra-cardiac magnetic probe*, Physica C: Superconductivity **372-376**, 249–253 (2002).
 - [87] B. Dufay, S. Saez, M. Denoual, C. Dolabdjian, F. Ludwig, E. Heim, M. Schilling, L. Melo, A. Yelon und D. Menard, *Magnetorelaxometry of Nanoparticles Using a GMI magnetometer*, Sensor Letters **7**, 429–432 (2009).
 - [88] J. Lenz und S. Edelstein, *Magnetic sensors and their applications*, IEEE Sensors Journal **6**, 631–649 (2006).
 - [89] D. Robbes, *Highly sensitive magnetometers – a review*, Sensors and Actuators A: Physical **129**, 86–93 (2006).
 - [90] C. Carr, A. N. Matlachov, H. Sandin, M. A. Espy und R. H. Kraus, *Magnetic Sensors for Bioassay: HTS SQUIDS or GMRs?*, IEEE Transactions on Applied Superconductivity **17**, 808–811 (2007).
 - [91] H. Brückl und J. Schotter, *Magnetoresistiver Nachweis von Biomolekülen (Magnetoresistive Detection of Biomolecules)*, Technisches Messen **12**, 577–581 (2005).
 - [92] F. Ludwig, E. Heim, S. Mäuselein, D. Eberbeck und M. Schilling, *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles with fluxgate magnetometers for the analysis of biological targets*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**, 690–695 (2005).
 - [93] E. Heim, F. Ludwig und M. Schilling, *Analysis of biological target concentrations in solution by magnetorelaxometry*, Biomedizinische Technik **49**, 420–421 (2004).
 - [94] F. Ludwig, S. Mäuselein, E. Heim und M. Schilling, *Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement*, Review of Scientific Instruments **76**, 106102 (2005).
 - [95] E. Heim, S. Mäuselein, F. Ludwig und M. Schilling, *High- T_c SQUID Magnetorelaxometry for the Analysis of Biological Target Concentration in Solution*, in *unpublished* (2004).
 - [96] S. Mäuselein, *Aufbau eines Messsystems zur magnetischen Relaxationsmessung für die Bioanalytik mit Fluxgate- und SQUID-Magnetometern*, Diplomarbeit, TU Braunschweig (2004).
 - [97] C. J. Dedman, K. G. H. Baldwin und M. Colla, *Fast switching of magnetic fields in a magneto-optic trap*, Review of Scientific Instruments **72**, 4055–4058 (2001).

- [98] Bartington Instruments Ltd, *Calibration Certificate* (1998).
- [99] Bartington Instruments Ltd, *Operation Manual for Mag-03 Three-Axis Magnetic Field Sensors*, Bartington Instruments Ltd (2007).
- [100] National Instruments, <http://www.ni.com> (2008).
- [101] Subversion, <http://www.subversion.com> (2008).
- [102] J. Lüdke, H. Ahlers und M. Albrecht, *Novel Compensated Moment Detection Coil*, IEEE Transactions on Magnetics **43**, 3567–3572 (2007).
- [103] I. Fleer, *Entwicklung eines digitalen Oszilloskops und einer universellen Plattform für integrierte Messgeräte*, Diplomarbeit, TU Braunschweig (2006).
- [104] Wavemetrics, *IGOR Pro 6*, <http://www.wavemetrics.com> (2008).
- [105] Norm, ISO/IEC Guide 98:1995, *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)* (2008).
- [106] EURACHEM / CITAC Leitfaden, QUAM:200.P1, S. L. R. Ellison, M. Rösslein und A. Williams, *Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen* (2004).
- [107] NORDTEST Report, TR 537, *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Enviromental Laboratories* (2004).
- [108] Eurolab Leitfaden, , *Leitfaden zur Ermittlung von Messunsicherheiten bei quantitativen Prüfergebnissen* (2006).
- [109] EURACHEM / CITAC Guide, , M. H. Ramsey und S. L. R. Ellison, *Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches* (2007).
- [110] C. Gron, J. B. Hansen, B. Magnusson, A. Nordbotten, M. Krysell, K. J. Andersen und U. Lund, *Uncertainty from sampling*, Technischer Bericht, Nordtest (2007).
- [111] D. Meeker, *FEMM 4.0.1*, <http://femm.foster-miller.net> (2008).
- [112] Eppendorf, *Dispensing with style manual and electronic multipete hand dispensers*, Eppendorf, Hamburg (2008).
- [113] E. Heim, F. Ludwig und M. Schilling, *Störsignalcharakterisierung einer magnetischen Abschirmkammer für biomagnetische Untersuchungen*, Vortrag, DPG Frühjahrstagung, Dresden (2003).
- [114] Norm, DIN 32645:2008-11, *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung* (2008).
- [115] H. Ott, *Noise reduction techniques in electronic systems*, Wiley-Interscience 1988.
- [116] ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (2008).

-
- [117] P. Martens, *Aufbau eines AC-Suszeptometriemeßplatzes zur Charakterisierung magnetischer Nanopartikel*, Studienarbeit, Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, TU Braunschweig (2005).
- [118] W. Krahn, M. Luckas und K. Lucas, *Determination of Particle Size Distribution in Fluids using photon correlation spectroscopy*, Particle and Particle Systems Characterization **5**, 72–76 (1988).
- [119] L. Hanus und H. Ploehn, *Conversion of Intensity-Averaged Photon Correlation Spectroscopy Measurements to Number-Averaged Particle Size Distributions. 1. Theoretical Development*, Langmuir **15**, 3091–3100 (1999).
- [120] L. Vékás, D. Bica und M. V. Avdeev, *Magnetic nanoparticles and concentrated magnetic nanofluids: Synthesis, properties and some applications*, China Particuology **5**, 43–49 (2007).
- [121] M. Feyen, E. Heim, F. Ludwig und A. M. Schmidt, *Magnetic Nanorotors with Tailored Field-Induced Dynamics*, Chemistry of Materials **20**, 2942–2948 (2008).
- [122] N.-S. Cheng, *Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture*, Industrial & Engineering Chemistry Research **47**, 3285–3288 (2008).
- [123] M. Wilchek und E. A. Bayer (Herausgeber), *Methods in Enzymology 184: Avidin-Biotin Technology*, Band 184, Academic Press 1990.
- [124] F. Breitling und S. Dübel, *Rekombinante Antikörper*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997.
- [125] M. Wilchek und E. A. Bayer, *Biotin-containing reagents*, Methods Enzymol **184**, 123–38 (1990).
- [126] E. A. Bayer, E. Skutelsky, M. Wilchek, D. B. McCormick und L. D. Wright, *Methods in enzymology*, Vitamins and Coenzymes Part D **62**, 308–315 (1979).
- [127] M. Wilchek und E. A. Bayer, *The avidin-biotin complex in immunology*, Immunology Today **5**, 39–43 (1984).
- [128] M. Wilchek und E. A. Bayer, *The avidin-biotin complex in bioanalytical applications*, Analytical Biochemistry **171**, 1–32 (1988).
- [129] E. A. Bayer und M. Wilchek, *Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations*, Journal of Chromatography A **510**, 3–11 (1990).
- [130] S. Rauf, D. Zhou, C. Abell, D. Klenerman und D. Kang, *Building three-dimensional nanostructures with active enzymes by surface templated layer-by-layer assembly*, Chemical Communications **16**, 1721–1723 (2006).
- [131] O. H. Laitinen, H. R. Nordlund, V. P. Hytonen und M. S. Kulomaa, *Brave new (strept)avidins in biotechnology*, Trends in Biotechnology **25**, 269–277 (2007).
- [132] E. Diamandis und T. Christopoulos, *The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology*, Clinical Chemistry **37**, 625–636 (1991).

- [133] M. Heidelberger und F. E. Kendall, *A Quantitative Study of the Precipitin Reaction between Type III Pneumococcus Polysaccharide and Purified Homologous Antibody*, Journal of Experimental Medicine **50**, 809–823 (1929).
- [134] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung und H. Ichikawa, *Hydrogels in pharmaceutical formulations*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **50**, 27–46 (2000).
- [135] E. Heim, S. Harling, K. Pöhlig, F. Ludwig, H. Menzel und M. Schilling, *Fluxgate magnetorelaxometry of superparamagnetic nanoparticles for hydrogel characterization*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials **311**, 150–154 (2007).
- [136] E. Heim, S. Harling, F. Ludwig, H. Menzel und M. Schilling, *Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and physical entrapment capacity*, Journal of Physics: Condensed Matter **20**, 204106 (2008).
- [137] C. R. Mayer, V. Cabuil, T. Lalot und R. Thouvenot, *Magnetic Nanoparticles Trapped in pH 7 Hydrogels as a Tool to Characterize the Properties of the Polymeric Network*, Advanced Materials **12**, 417–420 (2000).
- [138] K. Scheibe, H. Menzel und R. Daniels, *Poster presented at the DPhG Annual Meeting, Würzburg*, Poster presented at the DPhG Annual Meeting, Würzburg (2003).
- [139] S. V. Vlierberghe, V. Cnudde, P. Dubruel, B. Masschaele, A. Cosijns, I. D. Paepe, P. J. S. Jacobs, L. V. Hoorebeke, J. P. Remon und E. Schacht, *Porous Gelatin Hydrogels: 1. Cryogenic Formation and Structure Analysis*, Biomacromolecules **8**, 331–337 (2007).
- [140] H. Domininghaus, *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*, Springer Berlin Heidelberg 2005.
- [141] N. Sanabria-DeLong, S. K. Agrawal, S. R. Bhatia und G. N. Tew, *Controlling Hydrogel Properties by Crystallization of Hydrophobic Domains*, Macromolecules **39**, 1308–1310 (2006).
- [142] E. Heim, S. Harling, A. Schwoerer, F. Ludwig, H. Menzel und M. Schilling, *Superparamagnetische Nanoteilchen als Sonden für die Hydrogel-Charakterisierung mittels Fluxgate-Magnetorelaxometrie*, Poster, 7th German Ferrofluid Workshop (2006).

Tabellenverzeichnis

1.1	Einordnung von mikroskopischen und integralen Charakterisierungsverfahren für Ferrofluide.	26
2.1	Technische Daten der Helmholtz-Spulen.	37
2.2	Technische Daten der kompensierten Spule.	47
2.3	Normierte Parameter des FIR-Tiefpassfilters mit Kaiser-Fenster	52
3.1	Parameter der Kurvenanpassung für die nicht verschobene Messung und Mittelwerte über die skalierten verschobenen Messungen. Erweiterungsfaktor $k = 1$	59
3.2	Messunsicherheitsbudget des Messsystems.	66
3.3	Messunsicherheiten der homogenen Referenzproben. $N = 12$, $k = 1$	68
3.4	Spitze-Spitze-Werte B_{SS} der Leermessungen mit einem Crest-Faktor von 4.	78
3.5	Ergebnisse des experimentellen Modells eines Bindungsnachweises.	82
4.1	Vergleich der Charakterisierungsmethoden für die Kern- und hydrodynamischen Eigenschaften von magnetischen Nanopartikeln.	94
5.1	Viskosität von VE-Wasser-Glycerin-Gemischen in unterschiedlicher Gewichts-konzentration bei Temperaturen von 25 °C und 23,3 °C.	99
5.2	Materialien und Laborgeräte für den Bindungsnachweis zwischen Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln und Biotin-Agarose.	106
5.3	Unspezifische Bindung mit Biotin-Agarose.	109
5.4	Präzision unter Wiederholbedingungen und von Probe zu Probe gebundener superparamagnetischer Nanopartikel an Biotin-Agarose-Beads.	110
5.5	Materialien und Laborgeräte für die Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten Nanopartikeln und Biotin-BSA.	113
5.6	Ergebnisse der Eignungstests von Ferrofluiden mit verschiedenen Hüllmaterialien unter dem Einfluss von Fotoinitiator sowie UV-belichtet in VE-Wasser und in Fotoinitiator.	121
5.7	Daten der Belichtungsserien bezogen auf 150 μ L Hydrogel.	122

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau eines magnetischen Nanopartikels und dessen Anwendung in einem Bindungsassay in einem flüssigen Medium.	4
1.2	Prinzipieller Verlauf des zeitlichen Mittels der Koerzitivfeldstärke H_c in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser.	7
1.3	Winkeldefinitionen Φ und Ψ der leichten Achse und des magnetischen Moments eines magnetischen Nanopartikels zum äußeren Magnetfeld.	10
1.4	Abhängigkeit der Feldenergie vom Winkel Θ des magnetischen Moments zur leichten Achse für verschiedene Winkel Φ des äußeren Magnetfelds zur leichten Achse.	10
1.5	Langevin-Funktion $L(\alpha)$ in Abhängigkeit des (a) Kerndurchmessers d_K (b) Magnetisierungsflussdichte $\mu_0 H_{\text{mag}}$	12
1.6	Magnetisierungskurve eines (a) Ferromagneten (b) Superparamagneten. . .	13
1.7	Schematische Darstellung der Néel- und Brown-Relaxation eines magnetischen Nanopartikels.	15
1.8	Brown-, Néel- und effektive Relaxationszeiten magnetischer Nanopartikel aufgetragen gegen den Kerndurchmesser und hydrodynamischen Durchmesser. . .	17
1.9	Schematischer Messablauf eines magnetischen Relaxationsimmunoassay. . .	29
2.1	Fotografie des orthogonalen 3-achsigen Helmholtz-Spulensystems mit dreh- und verkippbarem Standfuß um den Mittelpunkt der Spulen.	37
2.2	Fotografie der Messelektronik mit Spulenansteuerung und Messwertaufnahme. . .	37
2.3	Prinzipiskizze der Spulenansteuerung.	38
2.4	Skizze der Spulenelektronik.	39
2.5	(a) Differentielle Fluxgate-Anordnung mit Probe. (b) Fotografie der Messeinheit mit Probe (ohne Abdeckung).	40
2.6	Veranschaulichung der Störfeldunterdrückung der differentiellen Fluxgate-Anordnung anhand einer Relaxationsmessung in unabgeschirmter Umgebung. . .	41
2.7	Geometrische Anordnung der Fluxgate-Magnetometer zur Probe. (a) Draufsicht. (b) Vorderansicht.	41
2.8	Messablauf einer MRX-Messung.	42
2.9	Bildschirmfoto der Systemsoftware für die Benutzung des MRX-Systems mit einem herkömmlichen Monitor.	44
2.10	Fotografie des entwickelten MRX-Analyzers.	45
2.11	Fotografie der im MRX-Analyzer eingesetzten EMG-Fluxgates.	46
2.12	Blockschaltbild der Hardwarekomponenten des MRX-Analyzers.	46

2.13	Simulation der magnetischen Feldhomogenität (a) des kompensierten Spulensystems und (b) einer Helmholtz-Spule. (c) Vergleich des axialen Abfalls des magnetischen Felds einer Helmholtz-Spule und der kompensierten Spule.	47
2.14	Bildschirmfoto der Benutzeroberfläche des berührungssensitiven TFT-Bildschirms.	49
2.15	Übersicht der umfangreichen Möglichkeiten zur Datenauswertung.	51
2.16	63 Koeffizienten des FIR-Tiefpassfilters mit Kaiser-Fenster (symmetrisch um $t = 0$).	52
3.1	Vergleichsmessungen einer Verdünnungsreihe mit dem Fluxgate-MRX-Forschungssystem und dem SQUID-MRX-System der PTB Berlin.	54
3.2	Vergleichsmessungen einer immobilisierten Probe mit dem Fluxgate-MRX-Forschungssystem und dem SQUID-MRX-System der PTB Berlin.	55
3.3	FEM-Simulation zur Rückkopplung der Fluxgate-Kompensationsspule auf die Probe.	56
3.4	Skizze der Abstandsmessung.	57
3.5	Einfluss des Abstands y des Fluxgates X auf die Messergebnisse.	58
3.6	Ursache-Wirkungs-Diagramm der vom Fluxgate registrierten magnetischen Flussdichte $\vec{B}(\vec{r}, t)$	61
3.7	Ursache-Wirkungs-Diagramm der Probe.	62
3.8	Ursache-Wirkungs-Diagramm der mathematischen Messauswertung.	63
3.9	Homogenitätsmessung der (a) Magnetisierungskurven, (b) Relaxationskurven.	70
3.10	(a) Skizze der Sedimentationsmessung, (b) Relative Abweichung der Sedimentationsmessung in %.	71
3.11	(a) Skizze der Hintergrundfeldmessung, (b) Relaxationskurven bei verschiedenen Hintergrundfeldern.	73
3.12	Kalibrierkurve und Linearität der immobilisierten Verdünnungsreihe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge C).	75
3.13	Variationskoeffizienten der immobilisierten Referenzverdünnungsreihe des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge C).	75
3.14	Einfluss der mathematischen Auswertung auf einen Bindungsnachweis für verschieden große magnetische Nanopartikel.	79
3.15	Experimentelles Modell eines Bindungsnachweises: (a) Skizze, (b) Relaxationskurven.	81
4.1	Schema der Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln.	85
4.2	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge A).	86
4.3	Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme des Ferrofluids DDM 128N.	86
4.4	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B). Länge der Maßstabsleiste (a) 50 nm, (b) 100 nm. (c) Histogramm der Kerngrößenverteilungen der TEM-Aufnahme (b). . . .	87
4.5	Messung der Magnetisierungskurve des immobilisierten Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B).	88

4.6	AC-Suszeptibilitätsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem am Institut aufgebauten Messplatz.	89
4.7	Anzahl-gewichtete hydrodynamische Größenverteilung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) bestimmt mit Photonenkorrelationsspektroskopie.	90
4.8	Relaxationsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem MRX-Forschungssystem und Kurvenanpassung mit dem MSM (1.37).	91
4.9	Relaxationsmessung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) mit dem MRX-Forschungssystem und Kurvenanpassung mit dem Cluster-MSM (1.38).	92
4.10	Vergleich der Kerngrößenverteilungen des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) aus MRX- und Magnetisierungsmessungen mit dem Histogramm aus TEM-Aufnahmen.	93
4.11	Vergleich der Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser- und Kerngrößenverteilung des Ferrofluids fluidMAG-12/AS (Charge B) aus MRX-, PCS- und AC-Suszeptibilitätsmessungen.	94
5.1	Einfluss der Viskosität der Trägerflüssigkeit.	100
5.2	Kurvenanpassungsparameter der gestreckten Exponentialfunktion.	101
5.3	Skizze der Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln und biotinylierten Agarose-Beads.	104
5.4	Bindungskinetik von Streptavidin-funktionalisierten superparamagnetischen Nanopartikeln und biotinylierter Agarose-Beads über einen Zeitbereich von 1 bis 170 Min.	107
5.5	Anteil der an biotinylierten Agarose-Beads immobilisierten superparamagnetischen Nanopartikel in Abhängigkeit von der Agarose-Bead-Menge und Bindungszeit. Kontrollversuche mit unterschiedlich geblockten Nanopartikeln.	109
5.6	Skizze der Bindung zwischen Streptavidin-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln und biotinyliertem BSA.	112
5.7	(a) Relaxationskurven ausgewählter Proben und der Referenzproben. (b) Kompetitive Entwicklung der Clustergröße und Anteil immobilisierter Nanopartikel in Abhängigkeit der Biotin-BSA Konzentration.	114
5.8	Fotografie der Proben zur visuellen Demonstration der Vernetzung.	114
5.9	Bindungskinetik von Streptavidin-funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln und biotinyliertem BSA von 1 Min. bis 130 Min.	116
5.10	Schema der UV-Fotovernetzung des Hydrogels mit mechanisch eingebundenen superparamagnetischen Nanopartikeln.	118
5.11	Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von gefriergetrockneten und goldbeschichteten Hydrogelen (a) ohne und (b) mit superparamagnetischen Nanopartikeln.	119
5.12	Ergebnisse des Stabilitätstests ausgewählter Ferrofluide.	120
5.13	Fotografien der „vial inversion tests“ der Hydrogel-Belichtungsserien.	123
5.14	Zeitlicher Verlauf der Relaxationskurven der Hydrogel-Belichtungsserie II und der Referenzproben.	124
5.15	Zeitlicher Verlauf der Kurvenanpassungsparameter $B_{\text{ungebunden}}$, $\tau_{\text{ungebunden}}$ und $B_{\text{immobilisiert}}$ für die Belichtungsserie.	125
5.16	Vernetzungskinetiken der Belichtungsserien I-V.	126

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der Technischen Universität Braunschweig. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Kollegen, Freunden und Bekannten bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Meinhard Schilling für die Übertragung dieser interessanten und interdisziplinären Forschungsarbeit und der diesbezüglichen fachlichen Diskussionen sowie für die übertragende Verantwortung und gewährte Freiheit während meiner Tätigkeit am Institut.

Prof. Dr. Dietmar C. Hempel für die Mitberichterstattung und die hervorragende Leitung der interdisziplinären Zusammenarbeit im SFB 578.

Prof. Dr. Marc Tornow für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

AOR Dr. rer. nat. Frank Ludwig für die sehr gute Begleitung, Diskussionen und Zusammenarbeit im “Projekt Nanoteilchen”, durch die zahlreiche Veröffentlichungen und Besuche auf Konferenzen möglich wurden.

Allen Mitgliedern des SFBs 578 für die unkomplizierte und fruchtbare Zusammenarbeit sowie die Einblicke in neue interessante Themengebiete.

Insbesondere Steffen Harling, Ariane Schwörer und Prof. Dr. Henning Menzel für die produktive Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Hydrogel-Charakterisierung mittels der Magnetrelaxometrie.

Yvonne Göcke, Rochus Jonas, Kathrin Bohle, Alex Dalpiaz und Dr. Ingo Kampen für die Unterstützung in der Welt der Biotechnologie.

Allen Kollegen aus den durchgeführten Projekten und besuchten Konferenzen.

Dr. Dietmar Eberbeck, Dr. Uwe Steinhoff, Dr. Frank Wiekhorst und Prof. Dr. Lutz Trahms von der PTB Berlin für zahlreiche Diskussionen und Zusammenarbeit rund um die Magnetrelaxometrie.

Mathias Feyen, Thorsten Gelbrich und PD Dr. Annette M. Schmidt der Universität Düsseldorf für die Zusammenarbeit an außergewöhnlichen Nanopartikel-Hüllen.

Herrn Dr. Martin Albrecht, Herrn Heiko Ahlers, Dr. Sibylle Sievers, Dr. Kai-Felix Braun und Joachim Lüdke von der PTB Braunschweig für die magnetischen Diskussionen und die Einführung in die magnetische Messtechnik mit dem MPSM SQUID-Magnetometer.

Prof. Keiji Enpuku von der Kyushu Universität und Herrn Prof. Dr. Karl Maier sowie Christian Höhl vom Helmholtz-Institut für Strahlen- und Kernphysik der Universität Bonn für den Erkenntnisaustausch und gegenseitige Besuche.

Herrn Christian Bergemann und Dr. Rainer Quaas für die Diskussionen und Unterstützung mit zahlreichen Ferrofluiden.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die auch mal nicht fachlichen Gespräche und eine angenehme Atmosphäre.

Besonderen Dank gilt Herrn Jan Pförtner, Hartmut Müller und Harald Schmidt aus der feinmechanischen Werkstatt für die kompetenten Ideen und unbürokratische Herstellung vieler Werkstücke.

Allen Studenten des Instituts und besonders den von mir betreuten Studenten, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Halbleitertechnik, die mich zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit in ihrem Reinraum aufgenommen haben.

Meinen Eltern und meiner Familie für die jahrelange Unterstützung. Insbesondere Peter, der schon in frühen Tagen die Weichen meiner Entwicklung mit zahlreichen interdisziplinären Experimentierkästen gestellt hat.

Sachregister

- 3-achsige-Helmholtz-Spule, 36
- Agglomeration, 5
- Beschreibungsdatei .hdr, 43
- Bestimmungsgrenze, 76
- Bindungskinetik, 105
- Biotin-Agarose-Beads, 104
- Biotin-BSA, 112
- Bloch-Wand, 7
- Boltzmann-Verteilung, 11
- Charakterisierungsmethoden
 - magnetische Gleichfeld-Suszeptibilität, 24
 - magnetische Wechselfeld-Suszeptibilität, 25
 - Magnetkraftmikroskopie, 24
 - Magnetrelaxation, 25
 - Photonenkorrelationsspektroskopie, 24
 - Rasterelektronenmikroskopie, 23
 - Rasterkraftmikroskopie, 24
 - Transmissionselektronenmikroskopie, 23
- Cluster-Momenten-Superpositions-Modell, 20
- Cotton-Mouton-Effekt, 27
- Doppelbrechung, 27
- Effektive Anisotropie, 9
- Einbettungskapazität, 126
- Eindomänenpartikel, 7
- Enzyme-linked immunosorbent assay, 28
- Erfassungsgrenze, 76
- Feldenergie, magnetostatisch, 7
- Formanisotropie, 9
- Freisetzungskinetik, 127
- gestreckte Exponentialfunktion, 22
- Glycerin-Wasser-Gemisch, 98
- Heidelberger-Kendall-Kurve, 115
- Hydrogel, 117
- Hyperthermiebehandlung, 6
- Kernspintomografie, 6
- Koerzitivfeldstärke, 7
 - makroskopisch, 13
 - mikroskopisch, 10
- kompensiertes Spulensystem, 46
- Kontrastmittel, 6
- Kristallanisotropie, 8
- Langevin-Funktion, 11
- logarithmische Funktion, 21
- Magnetfeld, reduziert, 18
- Magnetic Particle Imaging, 6
- Magnetisches Relaxationsimmunoassay, 28
- Magnetisierung, 7
- magnetooptischen Relaxation, MORFF, 27
- Mehrdomänenpartikel, 7
- Messaufnehmer, 39, 48
- Messwertaufnahme, 48
- Momenten-Superpositions-Modell, 20
- MRX-Analyzer, 45
- MRX-Forschungssystem, 36
- Nachweisgrenze, 76
- Nachweistest
 - heterogen, 27
 - homogen, 27
- Präzision, 69
- reduzierter Parameter h , 11
- Relaxation

- Brown, 15
- effektive, 16
- Néel, 16
- Sättigungsremanenz, 13
- Sedimentation, 5
- Sensoren, 33
 - AMR, 33
 - Fluxgate, 32
 - Giant Magneto-Impedance, 33
 - GMR, 33
 - SQUID, 32
 - TMR, 33
- Spulenelektronik, 38, 47
- Standardmessparameter
 - flüssige Proben, 65
 - immobilisierte Proben, 74
- Statistikdatei .sta, 43
- Stoner-Wohlfarth-Modell, 9
- Stoner-Wohlfarth-Partikel, 9
- Streptavidin-Biotin-Affinitätssystem, 103
- Systemhardware, 42, 48
- Systemsoftware, 42, 48
- Varianzhomogenität, 76
- Variationskoeffizient, 69
- Verlaufsdatei .ver, 43
- Vernetzungskinetik, 126
- Viskosität
 - dynamisch, 98
 - Mikro-, 98
- Zeitabhängigkeit
 - linear logarithmisch, 21
 - modifiziert logarithmisch, 21
- Zeitkonstante
 - Brown, 16
 - charakteristische, 21
 - effektive, 16
 - Néel, 16
 - Néel, im Magnetfeld, 18

Magnetische Nanopartikel werden in vielen Bereichen der Medizin und Biotechnologie eingesetzt. Die bekanntesten Anwendungen sind der Einsatz als Kontrastmittel in der Kernspintomografie und zur Separation und Aufreinigung von Biomolekülen. Für alle Anwendungen werden spezialisierte Nanopartikel benötigt. Die Spezialisierung der Nanopartikel kann eine bestimmte Größe und Größenverteilung oder eine Funktionalisierung zur spezifischen Bindung an Zielsubstanzen sein.

In der Bioanalytik können die magnetischen Relaxationseigenschaften superparamagnetischer Nanopartikel für ein Nachweisverfahren von Biomolekülen genutzt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Messgerät entwickelt und charakterisiert, mit dem die Magnetrelaxation superparamagnetischer Nanopartikel mit hochempfindlichen Magnetfeldsensoren ohne aufwendige, magnetische Abschirmung bei Raumtemperatur gemessen werden kann. Für die Messung und die Auswertung der Messdaten wurden Programme entwickelt, und die Messunsicherheit sowie die Nachweisgrenze des Systems wurden in Hinblick auf Messungen von kleinsten Konzentrationen an magnetischen Nanopartikeln und Biomolekülen bestimmt.

Mit dem aufgebauten Messsystem wurden Bindungsexperimente mit superparamagnetischen Nanopartikeln an verschiedenen großen Zielsubstanzen durchgeführt, wobei Bindungskinetiken untersucht werden konnten. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 578 „Vom Gen zum Produkt“ wurde das Verfahren der Magnetrelaxometrie erstmals eingesetzt, um die Vernetzungskinetik und Einbettungskapazität von Hydrogelen zu bestimmen.

Nachdem die Messeinheit in einem ersten Forschungssystem getestet und eingesetzt worden war, wurde ein Demonstrator eines kompletten Messsystems inklusive Messdatenauswertung in der Größe eines 19“-Gehäuses aufgebaut. Ein solches Laborgerät ermöglicht die kostengünstige Qualitätssicherung und Anwendung von magnetischen Nanopartikeln in der Forschung und Industrie.